

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003232

International filing date: 21 February 2005 (21.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-045489  
Filing date: 20 February 2004 (20.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 07 April 2005 (07.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

21.02.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2004年 2月20日  
Date of Application:

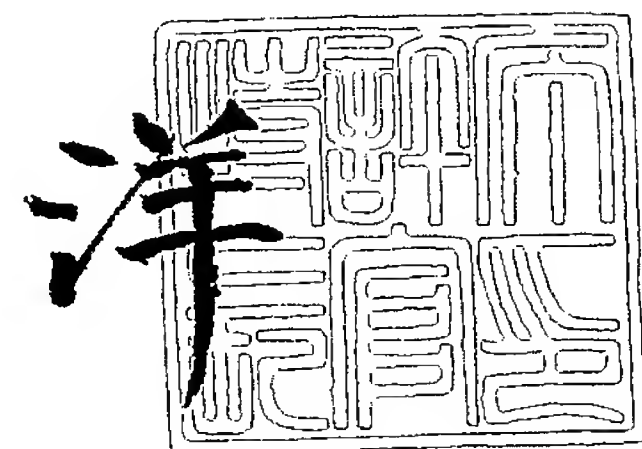
出願番号 特願2004-045489  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP2004-045489]

出願人 財団法人 東京都医学研究機構  
Applicant(s): 東レ株式会社

2005年 3月24日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2005-3026218

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P04-0110  
【提出日】 平成16年 2月20日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N 7/00  
C12N 15/00

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都板橋区成増 3 丁目 3 7 番 1 号 3 0 2 号室  
【氏名】 脇田 隆字

【発明者】  
【住所又は居所】 愛知県名古屋市瑞穂区松月町 1 丁目 4 1 番地 エミネンス石川橋  
2 0 6 号  
【氏名】 加藤 孝宣

【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県川崎市中原区新城 3 丁目 1 3 番 5 号 テラス新城 3 0 3  
号室  
【氏名】 伊達 朋子

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都府中市本宿町 1 丁目 3 2 番 1 号 サンライズヒル 7 - 2 0  
2 号室  
【氏名】 宮本 道子

【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市手広 1 1 1 1 番地 東レ株式会社 基礎研究所  
医薬研究所内  
【氏名】 田邊 純一

【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市手広 1 1 1 1 番地 東レ株式会社 基礎研究所  
医薬研究所内  
【氏名】 曾根 三郎

【特許出願人】  
【識別番号】 591063394  
【氏名又は名称】 財団法人 東京都医学研究機構

【特許出願人】  
【識別番号】 000003159  
【氏名又は名称】 東レ株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100091096  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】  
【識別番号】 100096183  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 石井 貞次

【選任した代理人】  
【識別番号】 100118773  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】  
     【識別番号】 100119183  
     【弁理士】  
     【氏名又は名称】 松任谷 優子  
 【手数料の表示】  
     【予納台帳番号】 015244  
     【納付金額】 21,000円  
 【提出物件の目録】  
     【物件名】 特許請求の範囲 1  
     【物件名】 明細書 1  
     【物件名】 図面 1  
     【物件名】 要約書 1



**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスのゲノムRNAの、5'非翻訳領域、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3'非翻訳領域と、少なくとも1つの選択マーカー遺伝子及び／又は少なくとも1つのリポーター遺伝子と、少なくとも1つのIRES配列と、を含む塩基配列からなる、レプリコンRNA。

**【請求項 2】**

前記塩基配列が、前記の5'非翻訳領域、少なくとも1つの選択マーカー遺伝子及び／又は少なくとも1つのリポーター遺伝子、少なくとも1つのIRES配列、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3'非翻訳領域を、5'から3'方向へこの順番で含む、請求項1記載のレプリコンRNA。

**【請求項 3】**

遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスのゲノムRNAが、配列番号12に示す塩基配列からなるRNAである、請求項1又は2記載のレプリコンRNA。

**【請求項 4】**

5'非翻訳領域が配列番号1に示す塩基配列からなり、coreタンパク質コード配列が配列番号2に示す塩基配列からなり、E1タンパク質コード配列が配列番号3に示す塩基配列からなり、E2タンパク質コード配列が配列番号4に示す塩基配列からなり、NS2タンパク質コード配列が配列番号5に示す塩基配列からなり、NS3タンパク質コード配列が配列番号6に示す塩基配列からなり、NS4Aタンパク質コード配列が配列番号7に示す塩基配列からなり、NS4Bタンパク質コード配列が配列番号8に示す塩基配列からなり、NS5Aタンパク質コード配列が配列番号9に示す塩基配列からなり、NS5Bタンパク質コード配列が配列番号10に示す塩基配列からなり、3'非翻訳領域が配列番号11に示す塩基配列からなる、請求項1～3のいずれか1項記載のレプリコンRNA。

**【請求項 5】**

以下の(a)又は(b)のRNAからなるレプリコンRNA。

(a) 配列番号13に示す塩基配列からなるRNA。

(b) 配列番号13に示す塩基配列において1～100個の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列からなるRNAであって、自律複製能及びウイルス粒子産生能を有するRNA。

**【請求項 6】**

請求項1～5のいずれか1項記載のレプリコンRNAを細胞に導入することを含む、該レプリコンRNAを複製しかつウイルス粒子を産生する細胞を製造する方法。

**【請求項 7】**

細胞が増殖性細胞である、請求項6記載の方法。

**【請求項 8】**

細胞が真核細胞である、請求項6又は7記載の方法。

**【請求項 9】**

真核細胞がヒト肝由来細胞、ヒト子宮頸由来細胞、又はヒト胎児腎由来細胞である、請求項8記載の方法。

**【請求項 10】**

真核細胞がHuh7細胞、HepG2細胞、IMY-N9細胞、HeLa細胞、又は293細胞である、請求項8記載の方法。

**【請求項 11】**

請求項6～10のいずれか1項記載の方法により製造される、レプリコンRNAを複製しかつウイルス粒子を産生する細胞。

**【請求項 12】**

請求項 1 1 記載の細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含む、C型肝炎ウイルス粒子の製造方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 記載の方法により製造される、C型肝炎ウイルス粒子。

【請求項 1 4】

請求項 1 1 記載の細胞を培養し、培養物中のウイルス粒子を他の細胞に感染させることを含む、C型肝炎ウイルス感染細胞を製造する方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 4 記載の方法によって製造される、C型肝炎ウイルス感染細胞。

【請求項 1 6】

被験物質の存在下で、下記(a)～(c)：

(a) 請求項 1 1 記載の細胞

(b) 請求項 1 5 記載のC型肝炎ウイルス感染細胞、並びに

(c) 請求項 1 3 記載のC型肝炎ウイルス粒子及びC型肝炎ウイルス感受性細胞、  
のうちの少なくとも1つを培養し、得られる培養物中のレプリコンRNA又はウイルス粒子を検出することを含む、抗C型肝炎ウイルス物質をスクリーニングする方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 3 記載のC型肝炎ウイルス粒子又はその一部分を抗原として使用して、C型肝炎ワクチンを製造する方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項記載のレプリコンRNAを使用して、遺伝子治療のための肝細胞指向性ウイルスベクターを製造する方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 8 に記載の方法により製造される、肝細胞指向性ウイルスベクター。

【請求項 2 0】

外来遺伝子をコードするRNAを請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項記載のレプリコンRNA中に挿入し、それを細胞中に導入することを含む、該細胞内で外来遺伝子を複製及び／又は発現させる方法。

【請求項 2 1】

配列番号 1 2 に示す塩基配列からなるRNAを細胞に導入することを含む、該RNAを複製しかつウイルス粒子を産生する細胞を製造する方法。

【請求項 2 2】

配列番号 1 2 に示す塩基配列からなるRNAを細胞に導入し、その細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含む、C型肝炎ウイルス粒子の製造方法。

【請求項 2 3】

細胞が増殖性細胞である、請求項 2 1 又は 2 2 記載の方法。

【請求項 2 4】

配列番号 1 2 に示す塩基配列からなるRNAに外来遺伝子をコードするRNAを挿入し、それを細胞に導入し、その細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含む、外来遺伝子を含有するウイルスベクターを製造する方法。

**【書類名】 明細書**

**【発明の名称】** ヒト C 型肝炎ウイルスの全長ゲノムを含む核酸構築物及び該核酸構築物を導入した組換え全長ウイルスゲノム複製細胞、並びにヒト C 型肝炎ウイルス粒子の作製方法

**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本発明は、C 型肝炎ウイルスの全長ゲノムを含む核酸構築物、C 型肝炎ウイルス粒子の in vitro での作製方法、及び作製した C 型肝炎ウイルス粒子の使用に関する。

**【背景技術】****【0 0 0 2】**

C 型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus、HCV) は、フラビウイルス科に属する、一本鎖の (+) 鎖センス RNA をゲノムとするウイルスであり、C 型肝炎の原因となることが知られている。

**【0 0 0 3】**

HCV は持続的に感染することにより慢性肝炎を引き起こす。現在、世界的規模で認められる慢性肝炎の主たる原因が HCV 持続感染である。実際、持続感染者の 5 0 % 程度が慢性肝炎を発症し、そのうち約 2 0 % の患者が 1 0 年～2 0 年を経て肝硬変に移行し、さらにその一部は肝癌といった致死的な病態へと進展する。

**【0 0 0 4】**

C 型肝炎に対する現在の主な治療は、インターフェロナー  $\alpha$ 、インターフェロナー  $\beta$ 、及びインターフェロナー  $\alpha$  とプリンヌクレオシド誘導体であるリバビリンとの併用療法により行われている。しかしながら、これらの治療を行っても、全治療者の約 6 0 % に治療効果が認められるだけであり、効果が出た後に治療を中止すると半分以上の患者が再燃する。

**【0 0 0 5】**

工業国において罹患率が高く、最終的に深刻な結果を招き、かつ現在は原因治療法が存在しない C 型肝炎に対する効果的な治療薬又は予防薬の開発は重要な目標である。そのため、HCV 特異的な化学療法、ワクチン療法の発展が切望されている。抗 HCV 薬開発のターゲットとしては、HCV の複製抑制や HCV の細胞感染の抑制が考えられる。

**【0 0 0 6】**

最近になって、HCV 由来の自律複製能を有する RNA として、HCV サブゲノム RNA レプリコンシステムが作製された (特許文献 1、2 及び 3、非特許文献 1～4)。HCV サブゲノム RNA レプリコンシステムは、HCV ゲノムの構造遺伝子を取り除いて代わりに選択薬剤マーカー遺伝子を挿入した HCV レプリコン RNA を作製し、そのレプリコン RNA を培養細胞内に導入し、細胞内でレプリコン RNA を自律的に複製させるシステムである。これにより、培養細胞を用いて HCV の複製機構を解析することが可能になったが、これは HCV ウイルスの増殖複製過程におけるウイルス RNA 複製のみを評価することが可能な実験系であり、HCV ウイルス粒子の感染細胞内での形成と細胞外への放出、さらに新たな細胞への感染という過程は解析できない。

**【0 0 0 7】**

現在、HCV ウイルス粒子の形成と細胞外への放出、さらに新たな細胞への感染という過程を評価する方法としては、チンパンジーなどの動物を用いた実験系しかない (非特許文献 5)。しかしながら、動物という生体をそのまま用いた実験系は、煩雑で解析が極めて困難である。したがって、HCV ウイルス粒子の感染細胞内での形成と細胞外への放出、さらに新たな細胞への感染という過程を解析および、これらの過程の阻害を作用メカニズムとした抗 HCV 薬を作製するには、これらの過程を再現できる極めて単純化した実験系、すなわち、培養実験系での HCV ウイルス粒子の作製系を構築する必要がある。

**【0 0 0 8】**

また、細胞培養系を用いて安定して HCV ウイルス粒子を供給可能になれば、ウイルスを弱毒化したり、分子生物学的手法を用いて非感染性の HCV ウイルスを作製したりして、そ



れをワクチンに用いることができる。

【0 0 0 9】

【特許文献1】 特開 2 0 0 1 - 1 7 1 8 7 号公報

【特許文献2】 国際出願 P C T / J P 0 3 / 1 5 0 3 8

【特許文献3】 特願 2 0 0 3 - 3 2 9 0 8 2

【非特許文献1】 Lohmann et al., Science, (1999) 285, p. 110-113

【非特許文献2】 Blight et al., Science, (2000) 290, p. 1972-1974

【非特許文献3】 Friebe et al., J. Virol., (2001) 75(24): p. 12047-12057

【非特許文献4】 Ikeda et al., J. Virol., (2002) 76(6): p. 2997-3006

【非特許文献5】 Kolykhalov et al., Science, (1997) 277, p. 570-574

【非特許文献6】 Kato et al., Gastroenterology, (2003) 125, p. 1808-1817

【非特許文献7】 Yanagi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., (1997) 96(16): p. 8738-87

43

【特許文献8】 Okamoto et al., J. Gen. Virol., (1991) 73, p. 2697-26704

【非特許文献9】 Aoyagi et al., J. Clin. Microbiol., (1999) 37(6): p. 1802-180

8

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 1 0】

本発明は、これまで成功していない、HCV全長ゲノム配列を含むRNAを効率良く複製する方法、及び全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを含有するHCVウイルス粒子を細胞培養系により製造する方法、を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0 0 1 1】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、HCVウイルス粒子を細胞培養系で作製する方法を開発した。すなわち、本発明は以下の通りである。

【0 0 1 2】

[1] 遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスのゲノムRNAの、5'非翻訳領域、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3'非翻訳領域と、少なくとも1つの選択マーカー遺伝子及び／又は少なくとも1つのリポーター遺伝子と、少なくとも1つのIRES配列と、を含む塩基配列からなる、レプリコンRNA。

【0 0 1 3】

このレプリコンRNAにおいては、好ましくは、前記塩基配列が、前記の5'非翻訳領域、少なくとも1つの選択マーカー遺伝子及び／又は少なくとも1つのリポーター遺伝子、少なくとも1つのIRES配列、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3'非翻訳領域を、5'から3'方向へこの順番で含む。

このレプリコンRNAのより好ましい実施形態では、遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスのゲノムRNAが、配列番号12に示す塩基配列からなるRNAである。

【0 0 1 4】

このレプリコンRNAのさらに好ましい実施形態では、5'非翻訳領域が配列番号1に示す塩基配列からなり、coreタンパク質コード配列が配列番号2に示す塩基配列からなり、E1タンパク質コード配列が配列番号3に示す塩基配列からなり、E2タンパク質コード配列が配列番号4に示す塩基配列からなり、NS2タンパク質コード配列が配列番号5に示す塩基配列からなり、NS3タンパク質コード配列が配列番号6に示す塩基配列からなり、NS4Aタンパク質コード配列が配列番号7に示す塩基配列からなり、NS4Bタンパク質コード配列が配列番号8に示す塩基配列からなり、NS5Aタンパク質コード配列が配列番号9に示す塩基

配列からなり、NS5Bタンパク質コード配列が配列番号10に示す塩基配列からなり、3'非翻訳領域が配列番号11に示す塩基配列からなる。

【0015】

[2] 以下の(a)又は(b)のRNAからなるレプリコンRNA。

(a) 配列番号13に示す塩基配列からなるRNA。

(b) 配列番号13に示す塩基配列において1～100個の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列からなるRNAであって、自律複製能及びウイルス粒子産生能を有するRNA。

【0016】

[3] 上記[1]又は[2]記載のいずれかのレプリコンRNAを細胞に導入することを含み、該レプリコンRNAを複製しかつウイルス粒子を産生する細胞を製造する方法。

この方法では、細胞が増殖性細胞であることが好ましい。あるいは、この方法における細胞は、真核細胞であることが好ましい。

この方法では、好ましくは、真核細胞はヒト肝由来細胞、ヒト子宮頸由来細胞、又はヒト胎児腎由来細胞である。さらに好ましくは、真核細胞がHuh7細胞、HepG2細胞、IMY-N9細胞、HeLa細胞、又は293細胞である。

【0017】

[4] 上記[3]記載の方法により製造される、レプリコンRNAを複製しかつウイルス粒子を産生する細胞。

【0018】

[5] 上記[4]記載の細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含み、C型肝炎ウイルス粒子の製造方法。

【0019】

[6] 上記[5]記載の方法により製造される、C型肝炎ウイルス粒子。

【0020】

[7] 上記[4]記載の細胞を培養し、培養物中のウイルス粒子を他の細胞に感染させることを含み、C型肝炎ウイルス感染細胞を製造する方法。

【0021】

[8] 上記[7]記載の方法によって製造される、C型肝炎ウイルス感染細胞。

【0022】

[9] 被験物質の存在下で、下記(a)～(c)：

(a) 上記[4]記載の細胞

(b) 上記[8]記載のC型肝炎ウイルス感染細胞、並びに

(c) 上記[6]記載のC型肝炎ウイルス粒子及びC型肝炎ウイルス感受性細胞、  
のうちの少なくとも1つを培養し、得られる培養物中のレプリコンRNA又はウイルス粒子を検出することを含み、抗C型肝炎ウイルス物質をスクリーニングする方法。

【0023】

[10] 上記[6]記載のC型肝炎ウイルス粒子又はその一部分を抗原として使用して、C型肝炎ワクチンを製造する方法。

【0024】

[11] 上記[1]又は[2]記載のいずれかのレプリコンRNAを使用して、遺伝子治療のための肝細胞指向性ウイルスベクターを製造する方法。

【0025】

[12] 上記[11]に記載の方法により製造される、肝細胞指向性ウイルスベクター。

【0026】

[13] 外来遺伝子をコードするRNAを上記[1]又は[2]記載のいずれかのレプリコンRNA中に挿入し、それを細胞中に導入することを含み、該細胞内で外来遺伝子を複製及び／又は発現させる方法。

【0027】

[14] 配列番号12に示す塩基配列からなるRNAを細胞に導入することを含み、該RNAを複製しかつウイルス粒子を産生する細胞を製造する方法。

## 【0028】

[15] 配列番号 12 に示す塩基配列からなる RNA を細胞に導入し、その細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含む、C 型肝炎ウイルス粒子の製造方法。

## 【0029】

[16] 細胞が増殖性細胞である、上記 [14] 又は [15] 記載の方法。

## 【0030】

[17] 配列番号 12 に示す塩基配列からなる RNA に外来遺伝子をコードする RNA を挿入し、それを細胞に導入し、その細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含む、外来遺伝子を含有するウイルスベクターを製造する方法。

## 【発明の効果】

## 【0031】

本発明により、HCV 由来のウイルス粒子を、細胞培養系を用いて作製する方法が提供される。本発明の全長 HCV レプリコン RNA 又は全長 HCV ゲノム RNA を細胞に導入することにより、他の細胞への感染能をもち、全長 HCV レプリコン RNA 又は全長 HCV ゲノム RNA を含有するウイルス粒子を *in vitro* で産生させることができる。また、本発明のレプリコン RNA を用いれば、細胞培養系において HCV の全長ゲノム RNA を含有する RNA を効率よく製造することができる。さらに、本発明の全長 HCV レプリコン RNA 若しくは全長 HCV ゲノム RNA を導入した細胞を用いれば、HCV の複製過程、ウイルス粒子形成過程、又はウイルス粒子の細胞外放出過程に影響を及ぼす各種物質をスクリーニングすることもできる。本発明のウイルス粒子を他の細胞に感染させる系を用いて、ウイルス粒子の細胞への感染に影響を及ぼす各種物質をスクリーニングすることもできる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0032】

以下、本発明について詳細に説明する。

## 1. 全長 HCV レプリコン RNA

C 型肝炎ウイルス (HCV) のゲノムは、約 9600 ヌクレオチドからなる (+) 鎖の一本鎖 RNA である。このゲノム RNA は、5' 非翻訳領域 (5' NTR 又は 5' UTR とともに表記する)、構造領域と非構造領域とから構成される翻訳領域、及び 3' 非翻訳領域 (3' NTR 又は 3' UTR とともに表記する) からなる。その構造領域には HCV の構造タンパク質がコードされており、非構造領域には複数の非構造タンパク質がコードされている。

## 【0033】

このような HCV の構造タンパク質 (core、E1、及び E2) と非構造タンパク質 (NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、及び NS5B) は、翻訳領域から一続きのポリプロテインとして翻訳された後、プロテアーゼによる限定分解を受けて遊離、生成される。これらの構造タンパク質及び非構造タンパク質 (すなわち、HCV のウイルスタンパク質) のうち、core はコアタンパク質であり、E1 及び E2 はエンベロープタンパク質である。非構造タンパク質はウイルス自身の複製に関与するタンパク質であり、NS2 はメタロプロテアーゼ活性、NS3 はセリンプロテアーゼ活性 (N 末端側の 3 分の 1) とヘリカーゼ活性 (C 末端側の 3 分の 2) を有することが知られている。さらに、NS4A は NS3 のプロテアーゼ活性に対するコファクターであり、NS5B は RNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性を有することも報告されている。

## 【0034】

本発明者らは、HCV ゲノム RNA を用いて、自律的に複製可能であり、かつウイルス粒子産生能を有するレプリコン RNA を構築した。

## 【0035】

本明細書では、自律複製能を有しており HCV ゲノム RNA を改変して作製された RNA を、「レプリコン RNA」又は「RNA レプリコン」と称する。本明細書において HCV 由来のレプリコン RNA は、HCV-RNA レプリコンとも称する。本明細書では、HCV ゲノム RNA の全長を含む本発明のレプリコン RNA を、「全長 HCV レプリコン RNA」と呼ぶ。本発明の全長 HCV レプリコン RNA は、ウイルス粒子産生能を有する。

## 【0036】



本発明の全長HCVレプリコンRNAの好適な実施形態では、C型肝炎ウイルスは、限定するものではないが、遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスであることが好ましい。本発明において、「遺伝子型2aのC型肝炎ウイルス」「遺伝子型2aのHCV」とは、Simmondsら (Simmonds, P. et al, Hepatology, (1994) 10, p. 1321-1324を参照) による国際分類に従って遺伝子型2aと同定されるC型肝炎ウイルスを意味する。本発明における「遺伝子型2aのC型肝炎ウイルス」「遺伝子型2aのHCV」には、天然由来のHCVゲノムRNAを有するウイルスだけでなく、天然由来のHCVゲノム配列に人為的な改変を加えたゲノムRNAを有するウイルスも包含する。遺伝子型2aのHCVの具体例としては、JFH-1株 (特開 2 0 0 2 - 1 7 1 9 7 8 号公報を参照) が挙げられる。

#### 【0037】

本明細書において「C型肝炎ウイルスのゲノムRNA」とは、C型肝炎ウイルスの一本鎖の(+)鎖センスRNAからなるゲノムの全長にわたる塩基配列を有するRNAを意味する。限定するものではないが、遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスのゲノムRNAとしては、配列番号12に示す塩基配列からなるRNAが好ましい。

#### 【0038】

本発明に係る全長HCVレプリコンRNAの一つの実施形態は、C型肝炎ウイルスのゲノムRNA上の、5'非翻訳領域、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3'非翻訳領域と、少なくとも1つの選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子と、少なくとも1つのIRES配列と、を含む塩基配列からなる、レプリコンRNAである。

#### 【0039】

限定するものではないが、好ましくは、本発明の全長HCVレプリコンRNAは、5'非翻訳領域、少なくとも1つの選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子、少なくとも1つのIRES配列、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3'非翻訳領域を、5'から3'方向へこの順番で含む。

#### 【0040】

本明細書において、「5'非翻訳領域 (5'NTR又は5'UTR)」、「coreタンパク質コード配列 (core領域又はC領域)」、「E1タンパク質コード配列 (E1領域)」、「E2タンパク質コード配列 (E2領域)」、「NS2タンパク質コード配列 (NS2領域)」、「NS3タンパク質コード配列 (NS3領域)」、「NS4Aタンパク質コード配列 (NS4A領域)」、「NS4Bタンパク質コード配列 (NS4B領域)」、「NS5Aタンパク質コード配列 (NS5A領域)」、「NS5Bタンパク質コード配列 (NS5B領域)」、及び「3'非翻訳領域 (3'NTR又は3'UTR)」、並びにその他の特定の領域若しくは部位は、遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスであるJFH-1株 (特開 2 0 0 2 - 1 7 1 9 7 8 号公報) のゲノムの全領域からなる全長ゲノムRNA (配列番号12) を基準として定めることができる。

#### 【0041】

あるいは、本願発明におけるC型肝炎ウイルス (HCV) ゲノム中の部分領域又はその部位は、JFH-1株のゲノムRNA (配列番号12) の部分塩基配列である配列番号1~11に示す配列を基準として定めることもできる。JFH-1株の全長ゲノムRNA (JFH-1クローン由来) (配列番号12) の「5'非翻訳領域」は、配列番号1に示す塩基配列からなる。また、「coreタンパク質コード配列」は配列番号2に示す塩基配列からなる。「E1タンパク質コード配列」は、配列番号3に示す塩基配列からなる。「E2タンパク質コード配列」は、配列番号4に示す塩基配列からなる。「NS2タンパク質コード配列」は、配列番号5に示す塩基配列からなる。「NS3タンパク質コード配列」は、配列番号6に示す塩基配列からなる。「NS4Aタンパク質コード配列」は、配列番号7に示す塩基配列からなる。「NS4Bタンパク質コード配列」は、配列番号8に示す塩基配列からなる。「NS5Aタンパク質コード配列」は、配列番号9に示す塩基配列からなる。「NS5Bタンパク質コード配列」は、配列番号10に示す塩基配列からなる。「3'非翻訳領域」は、配列番号11に示す塩基配列からなる。

列」は、配列番号 9 に示す塩基配列からなる。「NS5Bタンパク質コード配列」は、配列番号 10 に示す塩基配列からなる。「3' 非翻訳領域」は、配列番号 11 に示す塩基配列からなる。

#### 【0042】

例えば、HCV由来のRNA配列中の領域又は部位は、そのRNA配列を配列番号 1～12 に示す塩基配列に対してアラインメントし、配列番号 1～12 の配列中の塩基番号を基準として定めてもよい。このようなアラインメントにおいては、配列間でギャップ、付加、欠失、置換等が存在していてもよい。

#### 【0043】

本発明のさらなる好適な実施形態では、本発明の全長HCVレプリコンRNAに含まれる5' 非翻訳領域、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3' 非翻訳領域が、それぞれ配列番号 1～11 に示す塩基配列を有することが好ましい。

#### 【0044】

本発明に係る全長HCVレプリコンRNAの好適な実施形態は、配列番号 1～11 に示す塩基配列と、少なくとも 1 つの選択マーカー遺伝子及び／又はリポーター遺伝子と、少なくとも 1 つのIRES配列と、からなるレプリコンRNAである。

#### 【0045】

本発明において「選択マーカー遺伝子」とは、その遺伝子が発現された細胞だけが選択されるような選択性を細胞に付与することができる遺伝子を意味する。選択マーカー遺伝子の一般的な例としては抗生物質耐性遺伝子が挙げられる。本発明において好適な選択マーカー遺伝子の例としては、ネオマイシン耐性遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ピリチアミン耐性遺伝子、アデニリルトランスフェラーゼ遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子などが挙げられるが、ネオマイシン耐性遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子が好ましく、ネオマイシン耐性遺伝子がさらに好ましい。但し本発明における選択マーカー遺伝子はこれらに限定されるものではない。

#### 【0046】

また本発明において「リポーター遺伝子」とは、その遺伝子発現の指標となる遺伝子産物をコードするマーカー遺伝子を意味する。リポーター遺伝子の一般的な例としては、発光反応や呈色反応を触媒する酵素の構造遺伝子が挙げられる。本発明において好適なリポーター遺伝子の例としては、トランスポゾンTn9由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、大腸菌由来の $\beta$ グルクロニダーゼ若しくは $\beta$ ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、緑色蛍光タンパク質遺伝子、クラゲ由来のエクオリン遺伝子、分泌型胎盤アルカリフォスファターゼ (SEAP) 遺伝子等が挙げられる。但し本発明におけるリポーター遺伝子はこれらに限定されるものではない。

#### 【0047】

上記の選択マーカー遺伝子やリポーター遺伝子は、全長HCVレプリコンRNA中にどちらか一方のみが含まれていてもよいし、両方が含まれていてもよい。選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子は、全長HCVレプリコンRNAに 1 つ含まれていてもよいし、2 つ以上含まれていてもよい。

#### 【0048】

本発明における「IRES配列」とは、RNAの内部にリボソームを結合させて翻訳を開始させることが可能な内部リボソーム結合部位を意味する。本発明におけるIRES配列の好適な例としては、以下に限定するものではないがEMCV IRES (脳心筋炎ウイルスの内部リボソーム結合部位)、FMDV IRES、HCV IRES、等が挙げられるが、EMCV IRES、及びHCV IRESがより好ましく、EMCV IRESが最も好ましい。

#### 【0049】

本発明に係る全長HCVレプリコンRNAのさらに好ましい 1 つの実施形態は、配列番号 13 に示す塩基配列からなるRNAである。さらに、この配列番号 13 に示す塩基配列において



、1～100個、好ましくは1～30個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～6個、最も好ましくは1～数個（2～5個）の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列からなるRNAであって、かつ、自律複製能及びウイルス粒子産生能を有するRNAも、好適な実施形態として本発明の全長HCVレプリコンRNAの範囲に含まれる。

【0050】

本発明に係る全長HCVレプリコンRNAは、その全長HCVレプリコンRNAを導入する細胞内で発現させたい任意の外来遺伝子をコードするRNAをさらに含んでもよい。外来遺伝子をコードするRNAは、5'非翻訳領域の下流に連結してもよいし、選択マーカー遺伝子若しくはリポーター遺伝子の上流又は下流に連結させてもよいし、3'非翻訳領域の上流に連結してもよい。また、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、及びNS5Bタンパク質コード配列のいずれかの間に挿入してもよい。

【0051】

外来遺伝子をコードするRNAを含む全長HCVレプリコンRNAは、導入された細胞内で翻訳される際に、該外来遺伝子にコードされる遺伝子産物を発現することができる。従って外来遺伝子をコードするRNAを含む全長HCVレプリコンRNAは、外来遺伝子の遺伝子産物を細胞内で生成させることを目的とする場合にも、好適に使用することができる。

【0052】

本発明に係る全長HCVレプリコンRNAは、リボザイムを含んでいてもよい。全長HCVレプリコンRNA中の選択マーカー遺伝子及び／又はリポーター遺伝子の下流にリボザイムを連結しておき、そのリボザイムの自己切断活性によって、選択マーカー遺伝子及び／又はリポーター遺伝子が、IRES配列、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3'非翻訳領域から切り離されるようにすることもできる。

【0053】

本発明に係る全長HCVレプリコンRNAにおいては、上述したような選択マーカー遺伝子及び／若しくはリポーター遺伝子、ウイルスタンパク質をコードする配列、並びに外来遺伝子又はリボザイム等が、全長HCVレプリコンRNAから正しい読み枠で翻訳されるように連結される。全長HCVレプリコンRNAにコードされるタンパク質は、一続きのポリペプチドとして翻訳され発現された後でプロテアーゼによって各タンパク質へと切断され、遊離するように、プロテアーゼ切断部位等を介して互いに連結させることが好ましい。

【0054】

なお、本発明においてRNAが「自律複製能を有する」とは、RNAを細胞中に導入したときに、そのRNAが自己増殖することを意味する。限定するものではないが、RNAの自律複製能は、例えば、対象とするRNAをHuh7細胞中にトランスフェクションし、そのHuh7細胞を培養し、得られる培養物中の細胞から抽出したRNAについて、導入したRNAを特異的に検出可能なプローブを用いたノーザンブロットハイブリダイゼーションによりRNAを検出することによって、確認することができる。自律複製能を確認するための具体的な操作は、本明細書の実施例に記載されたコロニー形成能の測定、HCVタンパク質の発現確認、レプリコンRNAの検出等の記載に例示されている。

【0055】

さらに本発明において、RNAが「ウイルス粒子産生能を有する」とは、そのRNAを細胞（例えば、Huh7細胞などの培養細胞）に導入したときに、該細胞中でウイルス粒子が産生されることを意味する。ウイルス粒子産生能は、例えば、対象とするRNAを導入した細胞の培養上清について、そのRNAに特異的なプライマーを用いたRT-PCR法での検出を行う方法、又はその培養上清をシヨ糖濃度勾配法にかけてウイルス粒子を分離し、HCVタンパク質を検出する方法などにより、確認することができる。これらの具体的な操作は、本明細書の実施例に記載されたコロニー形成能の測定、HCVタンパク質の発現確認、レプリコンRNA

の検出等の記載に例示されている。

#### 【0056】

### 2. 全長HCVレプリコンRNAの作製

本発明に係る全長HCVレプリコンRNAは、当業者に公知である任意の遺伝子工学的手法を用いて作製することができる。限定するものではないが、全長HCVレプリコンRNAは、例えば遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスとしてJFH-1株を用いる場合には以下のような方法で作製することができる。

#### 【0057】

まず、JFH-1株のゲノム全領域のRNA（配列番号12）に対応するDNA（この配列は、国際DNAデータバンクにアクセッション番号AB047639として登録されている）を、常法により再構築してRNAプロモーターの下流に挿入して、DNAクローンを作製する。ここで、「RNAに対応するDNA」とは、当該RNAの塩基配列のU（ウラシル）をT（チミン）に置き換えた塩基配列からなるDNAを意味する。前記RNAプロモーターは、プラスミドクローン中に含まれるものであることが好ましい。好適なRNAプロモーターとしては、限定するものではないが、T7 RNAプロモーター、SP6 RNAプロモーター、SP3 RNAプロモーターが挙げられるが、T7 RNAプロモーターが特に好ましい。

#### 【0058】

次に、選択マーカー遺伝子及び／又はレポーター遺伝子、並びにIRES配列をコードするDNAを上記DNAクローンに挿入する。5'非翻訳領域の下流に、選択マーカー遺伝子及び／又はレポーター遺伝子を、さらにその下流にIRES配列を、挿入することが好ましい。

#### 【0059】

次いで、以上のようにして作製されたDNAクローンを鋳型として、RNAポリメラーゼによりRNAを合成する。RNA合成は、5'非翻訳領域から、常法により開始させることができる。DNAクローンがプラスミドクローンの場合には、プラスミドクローンから制限酵素によって切り出したDNA断片を鋳型として用いてRNAを合成することもできる。なお、合成されるRNAの3'末端がウイルスゲノムRNAの3'非翻訳領域の末端と一致しており、他の配列が付加されたり削除されたりしないことが好ましい。このようにして合成されるRNAが、本発明に係る全長HCVレプリコンRNAである。

#### 【0060】

### 3. HCV粒子の作製

上記のようにして作製される全長HCVレプリコンRNAを細胞に導入することにより、全長HCVレプリコンRNAを複製することができ、好ましくは持続的に複製することができる（すなわち、レプリコンRNAの複製能を有する）組換え細胞を得ることができる。本明細書では、全長HCVレプリコンRNAを複製している組換え細胞を「全長HCVレプリコンRNA複製細胞」と称する。

#### 【0061】

この全長HCVレプリコンRNA複製細胞は、ウイルス粒子を産生することができる。産生されたウイルス粒子は、HCVのウイルスタンパク質から構成されるウイルス殻中に全長HCVレプリコンRNAを含有する。従って本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞から産生されるウイルス粒子は、HCV粒子である。すなわち本発明では、全長HCVレプリコンRNA複製細胞を培養することにより、HCV粒子を細胞培養系にて作製することができる。好ましくは、全長HCVレプリコンRNA複製細胞を培養し、その培養物（好ましくは培養上清）中に産生されたウイルス粒子を採取することにより、HCV粒子を取得することができる。

#### 【0062】

あるいは、HCV粒子は、全長HCVゲノムRNAを導入して得られる組換え細胞によっても産生される。本発明に係る全長HCVゲノムRNA（好ましくはJFH-1クローン由来の全長HCVゲノムRNA、より好ましくは配列番号12に示す塩基配列を有するRNA）を導入した細胞では、その全長HCVゲノムRNAが高効率で複製される。本明細書では、全長HCVゲノムRNAを複製している組換え細胞を「全長HCVゲノムRNA複製細胞」と称する。この全長HCVゲノムRNA複製細胞によって産生されるウイルス粒子は、HCVのウイルスタンパク質から構成されるウイ



ルス殻中に全長HCVゲノムRNAを含有する。すなわち、本発明の全長HCVゲノムRNAを導入した細胞から産生されるウイルス粒子は、HCV粒子である。限定するものではないが、好ましくは、JFH-1クローン由来の全長HCVゲノムRNA（例えば、配列番号12に示す塩基配列を有するRNA）を導入した細胞を培養することによって、HCV粒子を細胞培養系にて作製することができる。例えば、全長HCVゲノムRNA（例えば、配列番号12に示す塩基配列を有するRNA）を導入した細胞を培養し、その培養物（好ましくは、培養上清）中に産生されたHCV粒子を採取することにより、HCV粒子を取得することができる。

#### 【0063】

上記の全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを導入する細胞としては、継代培養することが可能な細胞であれば任意の細胞を用いることができるが、真核細胞であることが好ましく、ヒト細胞であることがより好ましく、ヒト肝由来細胞、ヒト子宮頸由来細胞、又はヒト胎児腎由来細胞であることがさらに好ましい。これらの細胞としては、癌細胞、株や幹細胞株などを含む増殖性細胞が好ましく、Huh7細胞、HepG2細胞、IMY-N9細胞、HeLa細胞、又は293細胞等がさらに好ましい。これらの細胞は、市販のものを利用してよいし、細胞寄託機関から入手して使用してもよいし、任意の細胞（例えば癌細胞又は幹細胞）から株化した細胞を使用してもよい。

#### 【0064】

全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAの細胞内への導入は、当業者には公知の任意の技術を使用して行うことができる。そのような導入法としては、例えば、エレクトロポレーション、パーティクルガン法、リポフェクション法、リン酸カルシウム法、マイクロインジェクション法、DEAEセファロース法等が挙げられるが、エレクトロポレーションによる方法が特に好ましい。

#### 【0065】

全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAは、単独で導入してもよいし、他の核酸と混合させたものを導入してもよい。導入するRNA量を一定にしながら全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAの導入量を変更したい場合には、所望の導入量の全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを、導入する細胞から抽出したトータル細胞性RNAと混合して一定のRNA総量とし、それを細胞内導入に用いればよい。細胞内導入に用いるレプリコンRNAの量は、使用する導入法に応じて決めればよいが、好ましくは1ピコグラム～100マイクログラム、より好ましくは10ピコグラム～10マイクログラムの量を使用する。

#### 【0066】

全長HCVレプリコンRNA複製細胞は、全長HCVレプリコンRNAに含まれる選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子の発現を利用して、選択することができる。具体的には、例えば、そのような全長HCVレプリコンRNAの細胞内導入処理を施した細胞を、選択マーカー遺伝子の発現により選択可能となる培地において培養すればよい。あるいは、そのような全長HCVレプリコンRNAの細胞内導入処理を施した細胞を培養した後、リポーター遺伝子（例えば、蛍光タンパク質）の発現について検出すればよい。

#### 【0067】

一例として、全長HCVレプリコンRNAにネオマイシン耐性遺伝子が選択マーカー遺伝子と一併して含まれる場合には、その全長HCVレプリコンRNAを用いてエレクトロポレーション処理した細胞を培養ディッシュに播種し、12～72時間、好ましくは16～48時間培養した後、培養ディッシュにG418（ネオマイシン）を0.05ミリグラム/ミリリットル～3.0ミリグラム/ミリリットルの濃度で添加し、その後、週に2回培養液を交換しながら培養を継続し、播種時から好ましくは10日間～40日間、より好ましくは14日間～28日間培養した後にクリスタルバイオレットで生存細胞を染色することにより、導入された全長HCVレプリコンRNAが複製されている細胞を、コロニーとして選択することができる。

#### 【0068】

形成されたコロニーからは、常法により細胞をクローン化することができる。こうして得られる全長HCVレプリコンRNAを複製している細胞クローンを、本明細書では「全長HCVレプリコンRNA複製細胞クローン」と称する。本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞は

、全長HCVレプリコンRNA複製細胞クローンを包含する。

【0069】

全長HCVレプリコンRNA複製細胞については、複製された全長HCVレプリコンRNAを検出し、全長HCVレプリコンRNA中の選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子が細胞の宿主ゲノムDNAに組み込まれていないことを確認し、さらにHCVタンパク質の検出を行うことにより、実際に該細胞又は細胞クローンが全長HCVレプリコンRNAを複製していることを確認することができる。

【0070】

複製された全長HCVレプリコンRNAの検出は、当業者には公知の任意のRNA検出法に従って行えばよいが、例えば、細胞から抽出したトータルRNAについて、導入された全長HCVレプリコンRNAに対して特異的なDNA断片をプローブとして用いるノーザンハイブリダイゼーション法を実施することにより検出することができる。

【0071】

また全長HCVレプリコンRNA中の選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子が細胞の宿主ゲノムDNAに組み込まれていないことの確認は、限定するものではないが、例えば、細胞から抽出したゲノムDNAについて該選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子の少なくとも一部を増幅するPCRを行い、その増幅産物の有無を確認することによって行うことができる。増幅産物が確認された細胞では、宿主ゲノム中に選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子が組み込まれていると判断されることから、全長HCVレプリコンRNA自体は複製されていない可能性がある。この場合、全長HCVレプリコンRNAが複製されているか否かを、次に説明するHCVタンパク質の検出によって、さらに確認することができる。

【0072】

HCVタンパク質の検出は、例えば、導入された全長HCVレプリコンRNAから発現されるべきHCVタンパク質に対する抗体を、細胞から抽出したタンパク質と反応させることによって行うことができる。この方法は、当業者には公知の任意のタンパク質検出法によって行うことができるが、具体的には、例えば、細胞から抽出したタンパク質試料をニトロセルロース膜にブロッティングし、それに対して抗HCVタンパク質抗体（例えば、抗NS3特異的抗体、又はC型肝炎患者から採取した抗血清）を反応させ、さらにその抗HCVタンパク質抗体を検出することによって行うことができる。細胞から抽出したタンパク質中からHCVタンパク質が検出されれば、その細胞は、全長HCVレプリコンRNAを複製し、HCVタンパク質を発現しているものと判断することができる。

【0073】

本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞のウイルス粒子産生能は、当業者には公知の任意のウイルス検出法に従って確認すればよい。例えば、ウイルス粒子を産生していると思われる細胞の培養上清をショ糖密度勾配により分画し、各分画の密度、HCVコアタンパク質濃度、及び全長HCVレプリコンRNA若しくは全長HCVゲノムRNAの量を測定した結果、HCVコアタンパク質と全長HCVレプリコンRNA若しくは全長HCVゲノムRNAのピークが一致し、しかもそのピークが検出される画分の密度が、培養上清を25% NP40（ポリオキシエチレン(9)オクチルフェニルエーテル[Polyoxyethylene(9)Octylphenyl Ether]）で処理してから分画した場合の同画分の密度と比較して軽い（例えば、1.18~1.20 mg）場合には、該細胞はウイルス粒子産生能を有すると判定することができる。

【0074】

培養上清中に放出されたHCVウイルス粒子は、例えば、coreタンパク質、E1タンパク質、又はE2タンパク質に対する抗体を用いて検出することもできる。また、培養上清中の全長HCVレプリコンRNAを、特異的プライマーを用いたRT-PCR法により増幅して検出することによって、HCVウイルス粒子の存在を間接的に検出することもできる。

【0075】

4. 本発明のHCV粒子の他の細胞への感染

本発明のHCVウイルス粒子は、細胞（好ましくはHCV感受性細胞）への感染能を有する。本発明は、全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞を培養し、得ら



れた培養物（好ましくは、培養上清）中のウイルス粒子を他の細胞（好ましくはHCV感受性細胞）に感染させることを含む、C型肝炎ウイルス感染細胞を製造する方法にも関する。本発明において、HCV感受性細胞とは、HCVに対し感染性を有する細胞であり、好ましくは肝臓細胞またはリンパ球系細胞であるが、これらに限定されるものではない。具体的には、肝臓細胞としては初代肝臓細胞や、Huh7細胞、HepG2細胞、IMY-N9細胞、HeLa細胞、203細胞などが挙げられ、リンパ球系細胞としてはMolt4細胞や、HPB-Ma細胞、Daudi細胞などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0076】

本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞において産生されたHCV粒子を細胞（例えば、HCV感受性細胞）に感染させると、その感染細胞中では全長HCVレプリコンRNAが複製され、さらにウイルス粒子が形成される。全長HCVレプリコンRNA複製細胞において産生されたウイルス粒子に感染した細胞は、選択マーカー遺伝子及び／又はリポーター遺伝子を発現するので、その発現を利用して選択及び／又は検出することが可能である。本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞において産生されたウイルス粒子を細胞に感染させることにより、全長HCVレプリコンRNAが細胞内で複製され、ウイルス粒子をさらに製造することができる。

#### 【0077】

さらに、本発明の全長HCVゲノムRNA複製細胞において産生されたHCV粒子を細胞（例えば、HCV感受性細胞）に感染させることにより、その感染細胞中で全長HCVゲノムRNAが複製され、ウイルス粒子が形成される。本発明の全長HCVゲノムRNA複製細胞において産生されたウイルス粒子を細胞に感染させることにより、全長HCVゲノムRNAが細胞内で複製され、ウイルス粒子をさらに製造することができる。

#### 【0078】

本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞において産生されたHCVウイルス粒子は、チンパンジーなどのHCVウイルスに感染しうる動物に感染して、HCV由来の肝炎を引き起こすことができる。

#### 【0079】

### 5. 本発明の他の実施形態

本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞では、全長HCVレプリコンRNAが高効率で複製される。また本発明の全長HCVゲノムRNA複製細胞でも、全長HCVゲノムRNAが高効率で複製される。従って、本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞を用いて、全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを高効率で製造することができる。

#### 【0080】

本発明では、全長HCVレプリコンRNA複製細胞を培養し、培養物（培養細胞及び／又は培養培地）からRNAを抽出し、それを電気泳動法にかけ、分離された全長HCVレプリコンRNAを単離精製することによって、全長HCVレプリコンRNAを製造することができる。全長HCVゲノムRNA複製細胞を用いた場合にも、同様の方法で全長HCVゲノムRNAを製造することができる。このようにして製造されるRNAは、C型肝炎ウイルスの全長ゲノム配列を含む。この場合、C型肝炎ウイルスの全長ゲノム配列は、選択マーカー遺伝子及び／又はリポーター遺伝子並びにIRES配列によって分断されていてもよい。C型肝炎ウイルスの全長ゲノム配列を含むRNAの製造方法が提供されることにより、C型肝炎ウイルスゲノムに関してより詳細な分析が可能となる。

#### 【0081】

さらに本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞は、HCVタンパク質を製造するために好適に使用することができる。HCVタンパク質の製造は、当業者に周知の任意の方法によって行えばよいが、例えば、全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを細胞に導入して組換え細胞を作製し、該組換え細胞を培養し、得られる培養物（培養細胞及び／又は培養培地）から常法によりタンパク質を回収することによって行えばよい。

#### 【0082】

また本発明のHCVウイルス粒子は、肝細胞指向性を有しうる。そのため本発明の全長HCVレプリコンRNAを使用して、肝細胞指向性ウイルスベクターを製造することができる。このウイルスベクターは、遺伝子治療用に好適に用いられる。本発明では、外来遺伝子をコードするRNAを全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAに組み込み、そのRNAを細胞に導入することにより、該外来遺伝子を細胞中に導入し、細胞内で複製させ、さらに発現させることができる。さらに、全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNA中のE1タンパク質コード配列、及び／又はE2タンパク質コード配列を、他の生物種由来のウイルスの外殻タンパク質に変換したRNAを作製することにより、そのRNAを様々な生物種の細胞に感染させることも可能となる。この場合にも、全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAにさらに外来遺伝子を組み込んで、それを、該外来遺伝子を肝細胞で発現させるための肝細胞指向性ウイルスベクターとして使用することができる。

**【0083】**

本発明は、配列番号12に示す塩基配列からなるRNAに外来遺伝子をコードするRNAを挿入し、それを細胞に導入し、その細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含む、外来遺伝子を含有するウイルスベクターを製造する方法にも関する。

**【0084】**

本発明は、本発明に係るHCV粒子又はその一部分を抗原として用いて、C型肝炎ワクチンを製造する方法も提供する。

**【0085】**

本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞、又はそれらの細胞において産生されるウイルス粒子を感染させたC型肝炎ウイルス感染細胞は、例えばC型肝炎ウイルスの複製、ウイルス粒子の再構築、ウイルス粒子の放出を促進又は抑制する物質（抗C型肝炎ウイルス物質）をスクリーニングするための試験系として使用することもできる。具体的には、例えば、被験物質の存在下でそれらの細胞を培養し、得られる培養物中の全長HCVレプリコンRNA若しくは全長HCVゲノムRNA又はウイルス粒子を検出し、その被験物質がレプリコンRNA若しくは全長HCVゲノムRNAの複製又はウイルス粒子の形成若しくは放出を促進又は抑制するかどうかを判定することにより、C型肝炎ウイルスの増殖を促進又は抑制する物質をスクリーニングすることができる。この場合、培養物中の全長HCVレプリコンRNA若しくは全長HCVゲノムRNAの検出は、上記細胞から抽出したRNA中の全長HCVレプリコンRNA若しくは全長HCVゲノムRNAの量、割合若しくは有無を測定することによるものであってよい。培養物（主として培養上清）中のウイルス粒子の検出は、培養上清中に含まれるHCVタンパク質の量、割合若しくは有無を検出するものであってよい。

**【0086】**

本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞において産生されたHCV粒子とHCV感受性細胞とを、HCVの細胞への結合を促進又は抑制する物質をスクリーニングするための試験系として使用することもできる。具体的には例えば、被験物質の存在下で、本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞において産生されたHCV粒子とともにHCV感受性細胞を培養し、得られる培養物中の全長HCVレプリコンRNA又はウイルス粒子を検出し、その被験物質がレプリコンRNAの複製又はウイルス粒子の形成を促進又は抑制するかどうかを判定することにより、C型肝炎ウイルスの増殖を促進又は抑制する物質をスクリーニングすることができる。

**【0087】**

このような全長HCVレプリコンRNA若しくは全長HCVゲノムRNA又はウイルス粒子の検出は、上述の手法又は後述の実施例に従って行うことができる。上記試験系は、C型肝炎ウイルス感染の予防剤、治療剤若しくは診断剤の製造又は評価のためにも使用することができる。

**【0088】**

具体的には、本発明の上記試験系の利用例としては以下が挙げられる。

(1) HCVの増殖及び感染を抑制する物質の探索

HCVの増殖及び感染を抑制する物質としては、例えば、直接的若しくは間接的にHCVの増



殖及び感染に影響を及ぼす有機化合物、あるいはHCVゲノム若しくはその相補鎖の標的配列にハイブリダイズすることによりHCVの増殖若しくはHCVタンパク質の翻訳に直接的又は間接的に影響を及ぼすアンチセンスオリゴヌクレオチド等が挙げられる。

(2) 細胞培養中で抗ウイルス作用を有する各種物質の評価

前記各種物質としては、合理的ドラッグデザイン又はハイスループットスクリーニングを用いて得られた物質（例えば単離精製された酵素）等が挙げられる。

(3) HCVに感染した患者の治療のための、新規攻撃標的の同定

例えばHCVウイルス増殖のために重要な役割を果たす宿主細胞性タンパク質を同定するために、本発明に係る全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞を使用することができる。

(4) HCVウイルスの薬剤等に対する耐性獲得能の評価及び該耐性に関わる変異の同定

(5) C型肝炎ウイルス感染の診断薬又は治療薬の開発、製造及び評価のために使用可能な抗原としてのウイルスタンパク質の製造

(6) C型肝炎ウイルス感染のワクチンの開発、製造及び評価のために使用可能な抗原としてのウイルスタンパク質及び弱毒化HCVの製造

#### 【実施例】

##### 【0089】

本発明を、以下の実施例及び図面に基づいてさらに具体的に説明する。但し、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

##### 【0090】

[実施例1] 全長HCVゲノムRNA由来の全長HCVレプリコンRNAの作製

#### (A) 発現ベクターの構築

劇症肝炎の患者から分離したC型肝炎ウイルスであるJFH-1株（遺伝子型2a）のゲノム全長cDNAを含むDNA（JFH-1クローン）を、pUC19プラスミド中でT7 RNAプロモーター配列の下流に挿入したプラスミドDNAを作製した。

##### 【0091】

具体的には、JFH-1株のウイルスRNAを増幅したRT-PCR断片をpGEM-T EASY vector (Promega) にクローニングしてpGEM1-258、pGEM44-486、pGEM317-849、pGEM617-1323、pGEM1141-2367、pGEM2285-3509、pGEM3471-4665、pGEM4547-5970、pGEM5883-7003、pGEM6950-8035、pGEM7984-8892、pGEM8680-9283、pGEM9231-9634及びpGEM9594-9678の各プラスミドDNAを得た（非特許文献6を参照）。各プラスミドに含まれるウイルスゲノムRNA由来のcDNAをPCR法および制限酵素を用いてつなぎ合わせて、全長のウイルスゲノムcDNAをクローニングした。全長のウイルスゲノムの上流にT7 RNAプロモーター配列を挿入した。このようにして構築されたプラスミドDNAを、以下、pJFH1と称する（図1上段）。なお、上記JFH-1クローンの作製については、特許文献1及び非特許文献3に記載されている。またJFH-1クローンの全長cDNAの塩基配列は、国際DNAデータベース（DDBJ/EMBL/GenBank）のアクセッション番号：AB047639に登録されている。

##### 【0092】

次に、プラスミドDNAであるpJFH1の5' 非翻訳領域とcore領域の間に、EMCV-IRES（脳心筋炎ウイルスの内部リボゾーム結合部位）及びネオマイシン耐性遺伝子（neo；ネオマイシンホストランスフェラーゼ遺伝子とも称する）を挿入して、プラスミドDNAであるpFGREP-JFH1を構築した（図1の下段）。この構築手順は、既報（非特許文献4）に従った。また、pJFH1及びpFGREP-JFH1中のNS5B領域について、該領域にコードされるRNAポリメラーゼの活性中心に相当するアミノ酸モチーフGDDをGNDに変異させる突然変異を導入して、突然変異プラスミドクローンpJFH1/GND、及びpFGREP-JFH1/GNDも作製した。突然変異クローンpJFH1/GND及びpFGREP-JFH1/GNDは、それにコードされるNS5Bタンパク質の活性部位のアミノ酸配列が変異しているため、レプリコンRNAを複製するのに必要な活性NS5Bタンパク質を発現することができない。

##### 【0093】

(B) 全長HCVゲノムRNAと全長HCVレプリコンRNAの作製

全長HCVゲノムRNA合成及び全長HCVレプリコンRNA合成に用いる鋳型DNAを作製するために、上記のとおり構築した発現ベクターpJFH1、pJFH1/GND、pFGREP-JFH1、pFGREP-JFH1/GNDを、それぞれ制限酵素XbaIで切断した。次いで、これらのXbaI切断断片のそれぞれについて、10~20 $\mu$ gを50 $\mu$ lの反応液中に含有させ、Mung Bean Nuclease 20 Uを用いて30℃で30分間インキュベートすることにより、さらに処理した。Mung Bean Nucleaseは、二本鎖DNA中の一本鎖部分を選択的に分解する反応を触媒する酵素である。通常、上記XbaI切断断片をそのまま鋳型として用いてRNA合成を行うと、XbaIの認識配列の一部であるCUGAの4塩基が3'末端に余分に付加されたレプリコンRNAが合成されてしまう。そこで本実施例では、XbaI切断断片をMung Bean Nucleaseで処理することにより、XbaI切断断片からCUGAの4塩基を除去した。この後、XbaI切断断片を含むMung Bean Nuclease処理後の溶液について、通常法に従ったタンパク質除去処理により、CUGAの4塩基が除去されたXbaI切断断片を精製して、これを鋳型DNAとした。

#### 【0094】

次に、この鋳型DNAから、T7 RNAポリメラーゼを用いてRNAをin vitro合成した。このRNA合成にはAmbion社のMEGAscriptを用いた。鋳型DNAを0.5~1.0マイクログラム含む反応液20 $\mu$ lを製造業者の使用説明書に従って反応させた。

#### 【0095】

RNA合成終了後、反応溶液にDNase (2 U) を添加して37℃で15分間反応させた後、さらに酸性フェノールによるRNA抽出を行って、鋳型DNAを除去した。このようにしてpJFH1、pJFH1/GND、pFGREP-JFH1、pFGREP-JFH1/GNDに由来する上述の鋳型DNAから合成したRNAを、それぞれrJFH1、rJFH1/GND、rFGREP-JFH1、rFGREP-JFH1/GNDと命名した。これらのRNAの塩基配列を、rJFH1、rFGREP-JFH1については配列番号12及び13、rJFH1/GND、rFGREP-JFH1/GNDについては配列番号14及び15にそれぞれ示す。rJFH1は、JFH-1株の全長HCVゲノムと同じ配列構造をもつ、本発明の全長HCVゲノムRNAの一例である。rFGREP-JFH1は、本発明における全長HCVレプリコンRNAの一例である。

#### 【0096】

[実施例2] 細胞内における全長HCVゲノムRNA複製細胞とウイルス粒子産生

##### (C) 細胞内における全長HCVゲノムRNAの複製とウイルス粒子の産生

上記の通り合成した全長HCVゲノムRNA (rJFH1、rJFH1/GND) のそれぞれを、様々な量で、Huh7細胞から抽出したトータル細胞性RNAと混合して、RNA総量が10 $\mu$ gとなるように調製した。次いでその混合RNAをエレクトロポレーション法によりHuh7細胞に導入した。エレクトロポレーション処理を行ったHuh7細胞を培養ディッシュに播種し、12時間、24時間、48時間及び72時間培養した後に、細胞を回収して、細胞からRNAを抽出して、ノーザンブロットで解析した。ノーザンブロット解析は、Molecular Cloning, A laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> edition, J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis著、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)の記載に従って行った。具体的には、培養後の細胞から抽出したRNAを変性アガロース電気泳動に供し、泳動終了後にRNAをポジティブチャージナイロン膜に転写した。pJFH1から作製した<sup>32</sup>PラベルしたDNAまたはRNAプローブを、前記のとおり膜に転写したRNAに対しハイブリダイゼーションさせ、次いでその膜を洗浄し、それをフィルムに感光させることにより、JFH-1クローンの全長HCVゲノムRNAに特異的なRNAバンドを検出した。

#### 【0097】

図2に示すように、rJFH1/GNDをトランスフェクションした場合、トランスフェクション4時間後において、導入したRNAバンドは弱いシグナルとして確認できたが、時間の経過とともにシグナルは減弱し、24時間後にはほとんどバンドのシグナルが確認できなかった。一方、rJFH1をトランスフェクションした場合、トランスフェクションの4時間後~12時間後には、導入したRNAバンドのシグナルの強さはrJFH1/GNDを導入した場合と同様にいったん減弱したが、24時間以降にははっきりとしたRNAバンドのシグナルが確認できた。確認されたシグナルはHCVゲノムRNAに特異的であった。つまり導入した全長HCVゲノムRNAの一部が複製増殖したものと考えられた。RNA複製酵素であるNS5Bの活性モチー



フを変異させたrJFH1/GNDでは複製はみられず、NS5Bの活性が全長HCVゲノムRNAの複製に重要であることが示された。一方、これまでに分離されたH77株（非特許文献7）、J6株（非特許文献8）や本発明者らが慢性肝炎から分離したJCH1株（非特許文献6）などのC型肝炎ウイルス株に由来する全長HCVゲノムRNAについても同様の実験をおこなったが、これらの株では全長HCVゲノムRNAの複製は全く確認できなかった。

#### 【0098】

##### (D) トランスフェクション細胞培養液中のHCVウイルス粒子の検出

上記に従ってエレクトロポレーション処理を行ったHuh7細胞を培養ディッシュに播種し、12時間、24時間、48時間、及び72時間培養した後、培養上清中のHCVコアタンパク質を測定した。測定はオーソHCV抗原IRMAテストによって行った（非特許文献9）。図3に示す通り、rJFH1をトランスフェクションして48時間後及び72時間後の培養上清中にコアタンパク質が検出された。このコアタンパク質がウイルス粒子として分泌されているかどうかを確認するため、rJFH1をトランスフェクションした72時間後の培養液をショ糖密度勾配により分画した。60%（重量/重量）ショ糖溶液（50mM Tris pH7.5/0.1M NaCl/1mM EDTAに溶解）2ml、50%ショ糖溶液1ml、40%ショ糖溶液1ml、30%ショ糖溶液1ml、20%ショ糖溶液1ml、10%ショ糖溶液1mlを遠心チューブに重層し、さらにその上にサンプルの培養上清を4ml重層した。これをベックマンローターS W41Tiで400,000RPM、4℃、16時間遠心した。遠心終了後遠心チューブの底から0.5mlずつ分画回収した。各分画の密度、HCVコア蛋白濃度、全長HCVゲノムRNA量を定量した。全長HCVゲノムRNAの定量的RT-PCRによる検出は、Takeuchi T, Katsume A, Tanaka T, Abe A, Inoue K, Tsukiyama-Kohara K, Kawaguchi R, Tanaka S, Kohara M. Real-Time detection system for quantification of Hepatitis C virus genome. Gastroenterology 116: 636-642 (1999)に従い、全長HCVゲノムRNAの5'非翻訳領域のRNAを検出することによって行った。具体的には、細胞から抽出したRNAに含まれる全長HCVゲノムRNAを、合成プライマー、R6-130-S17: 5' -CGGGAGAGCCATAGTGG-3'（配列番号16）、R6-290-R19: 5' -AGTACCACAAGGCCTTTCG-3'（配列番号17）、TaqMan Probe: R6-148-S21FT, 5' -CTGCGGAACCGGTGAGTACAC-3'（配列番号18）とEZ rTth RNA PCR kitを用いてPCR増幅し、次いでABI Prism 7700 sequence detector systemにより検出した。

#### 【0099】

図4に示すように11番のフラクションでコアタンパク質と全長HCVゲノムRNAのピークが一致した。このフラクションの密度は約1.18mg/mlであり、これまで報告されているコアタンパク質と核酸の結合物よりも軽い比重であった。さらに培養上清を0.25% NP40で処理した後に同様の分画を行うと、コアタンパク質と全長HCVゲノムRNAのピークは比重約1.28mg/mlへとシフトした。つまり、NP40処理により、脂質を含む比重の軽い表面膜がウイルス粒子から剥離して、核酸とコアタンパク質のみのコア粒子となった結果、比重が重くなったと考えられた。以上の結果から、rJFH1をHuh7細胞へトランスフェクションすることにより細胞内で全長HCVゲノムRNAが複製されたこと、さらにウイルス粒子が形成され、培養上清中に分泌されたことが明らかになった。

#### 【0100】

##### [実施例3]

##### (E) 全長HCVレプリコンRNA複製細胞の作製及び細胞クローンの樹立

実施例1で作製したrFGREP-JFH1及びrFGREP-JFH1/GNDを、実施例2と同様にしてHuh7細胞へトランスフェクションして全長HCVレプリコンRNA複製細胞の作製を行い、さらに全長HCVレプリコンRNA複製細胞クローンの樹立を試みた。

#### 【0101】

まず、rFGREP-JFH1及びrFGREP-JFH1/GNDのそれぞれをHuh7細胞へトランスフェクションした後、培養ディッシュにその細胞を播種した。16時間から24時間培養した後にG418を様々な濃度で添加した。週に2回培養液を交換しながら培養を継続した。21日間培養した後、クリスタルバイオレットで生存細胞を染色した。染色されるコロニー数を計測し、トランスフェクションしたRNA重量あたりに得られたコロニー数を計算した。また、一

部の培養ディッシュでは生存細胞のコロニーをクローン化して培養を継続した。クローン化された細胞からRNA、ゲノムDNA、タンパク質をそれぞれ抽出した後、全長HCVレプリコンRNAの検出、ネオマイシン耐性遺伝子のゲノムDNAへの組み込みの有無、HCVタンパク質の発現を検討した。これらの結果の詳細は下記に示す。

#### 【0102】

##### (F) コロニー形成能

上記のトランスフェクションの結果、トランスフェクションしたレプリコンRNA 1  $\mu$ g 当たりのコロニー形成能は、rFGREP-JFH1をトランスフェクションしたHuh7細胞では、G418濃度が1.0 mg/mlの場合、368 CFU (Colony Forming Unit; コロニー形成単位)/ $\mu$ g $\cdot$ RNAであった(図5の左側)。これに対して、rFGREP-JFH1/GNDをトランスフェクションしたHuh7細胞では、コロニー形成が認められなかった(図5の右側)。このことは、rFGREP-JFH1レプリコンRNAをトランスフェクションしたHuh7細胞のコロニー形成能は、rFGREP-JFH1から発現されるNS5B (RNAポリメラーゼ) の活性に依存することを示した。つまり、コロニーを形成した細胞では、rFGREP-JFH1から発現されるNS5BのはたらきによりrFGREP-JFH1レプリコンRNAが自律複製することによって、ネオマイシン耐性遺伝子が持続的に発現されG418耐性が維持される結果、細胞増殖が可能になったものと考えられた。

#### 【0103】

##### (G) 樹立した細胞クローンにおける全長HCVレプリコンRNAの検出

上記(E)に従ってrFGREP-JFH1のHuh7細胞へのトランスフェクションにより樹立した全長HCVレプリコンRNA複製細胞クローンから、酸性フェノール抽出法によりトータルRNAを抽出した。次いでこのトータルRNAをノーザンブロット法により解析した。プローブとしてはpFGREP-JFH1特異的プローブを用いた。対照としては、トランスフェクションを行っていないHuh7細胞から同様に抽出したトータルRNA(図6中、「Huh7」として示す)、Huh7細胞から抽出したトータルRNAに試験管内で合成したレプリコンRNAを10の7乗コピー加えたサンプル(図6中、「 $10^7$ 」として示す)、及びHuh7細胞から抽出したトータルRNAに試験管内で合成したレプリコンRNAを10の8乗コピー加えたサンプル(図6中、「 $10^8$ 」として示す)を用いた。図6中、1~4は細胞クローンの番号である。

#### 【0104】

この結果、rFGREP-JFH1と同程度の大きさのRNAがpFGREP-JFH1特異的プローブにより検出された(図6)。これにより、トランスフェクションしたrFGREP-JFH1レプリコンRNAが細胞クローン内で複製増殖していることが確認された。また細胞クローン間で、レプリコンRNAの量に差があることが示された。図6中、例えば、クローン2はレプリコンRNAの量が他のクローンに比べて少なかった。

#### 【0105】

##### (H) ネオマイシン耐性遺伝子のゲノムDNAへの組み込みの有無の確認

(E)に従って得られた細胞クローン1~8(図7中ではFGR-JFH1/2-1~FGR-JFH1/2-8と表記)について、その細胞クローンのG418に対する耐性がネオマイシン耐性遺伝子の宿主細胞ゲノムへの組み込みによるものでないことを確認するために、ネオマイシン耐性遺伝子特異的プライマー(センスプライマー、NEO-S3: 5'-AACAAGATGGATTGCACGCA-3'(配列番号19)、アンチセンスプライマー、NEO-R: 5'-CGTCAAGAAGCGGATAGAAG-3'(配列番号20))を用いて、細胞クローンから抽出した宿主細胞のゲノムDNAを鋳型とするPCR増幅を行った。この結果、図7に示すとおり、ネオマイシン耐性遺伝子の増幅が示された陽性クローンは認められなかった。

#### 【0106】

この(H)の結果から、本発明の全長HCVレプリコンRNAをトランスフェクションし樹立した細胞クローンでは、全長HCVレプリコンRNAが複製されていることが確認された。

#### 【0107】

##### (I) HCVタンパク質の検出

rFGREP-JFH1をトランスフェクションし樹立した細胞クローンから常法によりタンパク質を抽出して、SDS-PAGE及びウエスタンブロット法による解析を行った。調べた細胞クロー

ーンは、上記 (G) で用いたものと同じである。合成した全長HCVゲノムRNAをHuh7細胞に一過性にトランスフェクションして得られた細胞抽出液を陽性対照とした (図 8、図 9 及び図 10 中、JFH-1として示す)。HCVのサブジェノミックRNAレプリコン (SGR-JFH1) をトランスフェクションして得られたクローン細胞抽出液をcoreタンパク質の陰性対照として、及びNS3、NS5aタンパク質の陽性対照として用いた (図 8、図 9 及び図 10 中、SGR-JFH1として示す)。トランスフェクションしていないHuh7細胞抽出液は全ての陰性対照として用いた (図 8、図 9 及び図 10 中、Huh7として示す)。それぞれの細胞クローンから抽出したタンパク質試料をPVDF膜 (Immobilon-P, Millipore社製) にブロッティングし、抗core特異的抗体及び抗NS3特異的抗体 (Dr. Moradpour より分与されたもの; Wolk B, et al, J. Virology. 2000; 74: 2293-2304) を用いて、全長HCVレプリコンRNAにコードされているcoreタンパク質及びNS3タンパク質を検出した。図 8 及び図 9 に示される通り、rFGREP-JFH1をトランスフェクションし樹立した細胞クローン 1~4 では、それぞれのタンパク質について陽性対照と同じ大きさのタンパク質が検出された。トランスフェクションしていないHuh7細胞ではcoreタンパク質、及びNS3タンパク質も検出されなかったため、細胞クローン 1~4 では、トランスフェクションされた全長HCVレプリコンRNAが自律複製し、さらにcoreタンパク質やNS3タンパク質が発現されていることが確認された。

#### 【0108】

なお、C型肝炎患者の血清を抗体として用いることにより、上記でNS3タンパク質の発現が確認された各細胞クローンについて、全長HCVレプリコンRNAからのNS5Aタンパク質の発現も同様に確認した (図 10)。

#### 【0109】

以上の (H) 及び (I) の結果から、全長HCVレプリコンRNAをトランスフェクションし樹立した細胞クローンでは、全長HCVレプリコンRNAが複製され、さらにウイルスタンパク質が発現されていることが確認された。

#### 【0110】

#### (J) 全長HCVレプリコンRNA複製細胞におけるウイルス粒子産生

上記 (E) に従ってrFGREP-JFH1をHuh7細胞へトランスフェクションし、樹立した全長HCVレプリコンRNA複製細胞クローン 2 及び 3 (FGR-JFH1/2-3) の培養上清を回収して、上記 (D) と同様の方法で、培養上清中のHCVウイルス粒子を測定した。この結果を図 11 に示す。図 11 中、網掛けの円は各フラクション (画分) の比重 (g/ml) を示す。また黒塗りの円は、coreタンパク質の量 (fmol/L) を示す。白抜きの円は、全長HCVレプリコンRNAの力価 ( $\times 0.1$  コピー/mL) を示す。

#### 【0111】

図 11 に示すように、比重が約 1.18~1.20 mg/ml となるフラクションで、coreタンパク質と全長HCVレプリコンRNAのピークは一致していた。またそれよりも軽い分画にも小さなピークを認めた。以上の結果から、rFGREP-JFH1をトランスフェクションしたHuh7細胞中では、全長HCVレプリコンRNAが複製されたこと、及びウイルス粒子が形成されて培養上清中に分泌されたことが示された。

#### 【0112】

#### [実施例 4]

#### (K) 培養上清中のウイルス粒子の感染実験

(H) で用いた細胞クローン 1~8 (FGR-JFH1/2-1、FGR-JFH1/2-2、FGR-JFH1/2-3、FGR-JFH1/2-4、FGR-JFH1/2-5、FGR-JFH1/2-6、FGR-JFH1/2-7、FGR-JFH1/2-8) のそれぞれの培養上清をHuh7細胞に添加して、培養上清中のウイルス粒子をHuh7細胞に感染させた。感染翌日に感染させたHuh7細胞の培養液にG418を 0.3mg/ml 添加し、さらに 21 日間培養した。培養終了後に細胞を固定し、クリスタルバイオレットで染色したところ、FGR-JFH1/2-3、FGR-JFH1/2-5、FGR-JFH1/2-6の培養上清を用いて感染させた細胞についてコロニー形成が観察された。一方、対照に用いたサブジェノミックレプリコン細胞SGR-JFH1/4-1 (非特許文献 6 記載) の培養上清を用いて感染させた細胞ではコロニー形成はみられなかった。図 12 に、FGR-JFH1/2-3とSGR-JFH1/4-1の培養上清 4 ml または 8 ml をHuh7細胞に添加し、2



1 日間培養した後に染色した培養ディッシュの写真を示す。FGR-JFH1/2-3の培養上清 4 ml を添加した細胞を播種したディッシュには 3 コロニー、FGR-JFH1/2-3の培養上清 8 ml を添加した細胞を播種したディッシュには 9 コロニーの形成を確認した。しかし、SGR-JFH1/4-1の培養上清を添加した細胞を播種したディッシュではコロニー形成はみられなかった。

#### 【0 1 1 3】

FGR-JFH1/2-3、FGR-JFH1/2-5の培養上清を用いて C 型肝炎ウイルスに感染させ、形成されたコロニーを、次いでクローン化した。FGR-JFH1/2-3の培養上清を用いた培養ディッシュから、FGR-JFH1/C2-3-11、FGR-JFH1/C2-3-12、FGR-JFH1/C2-3-13の 3 クローンを樹立した。FGR-JFH1/C2-5の培養上清を用いた培養ディッシュから、FGR-JFH1/C2-5-11、FGR-JFH1/C2-5-12の 2 クローンを樹立した。

#### 【0 1 1 4】

FGR-JFH1/C2-3-11、FGR-JFH1/C2-3-12、FGR-JFH1/C2-3-13、FGR-JFH1/C2-5-11、FGR-JFH1/C2-5-12の各細胞クローンの培養上清を用いて再度Huh7細胞を感染させると、FGR-JFH1/C2-3-12、FGR-JFH1/C2-5-12の培養上清を用いた培養ディッシュではコロニーの形成が観察された。FGR-JFH1/C2-3-12の培養上清を用いて感染させた細胞から、さらにFGR-JFH1/C2-3-12-1、FGR-JFH1/C2-3-12-2の 2 クローンを樹立した。FGR-JFH1/C2-5-12の培養上清を用いて感染させた細胞から、さらにFGR-JFH1/C2-5-12-1、FGR-JFH1/C2-5-12-2の 2 クローンを樹立した。

#### 【0 1 1 5】

以上の通り全長HCVレプリコンRNA複製細胞の培養上清を用いて感染させ、その感染細胞より樹立したこれらの細胞クローンから、RNA、タンパク質、ゲノムDNAを抽出した。ゲノムDNAを鋳型としたPCRでネオマイシン耐性遺伝子の組み込みの有無を検討したところ、いずれも陰性であった。また、RNAを鋳型とする定量的PCR法により、細胞内で複製している全長HCVレプリコンRNAを検出することができた。さらに培養上清中にcoreタンパク質を検出することができた。この結果は、本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞から産生された全長HCVレプリコンRNAを含むウイルス粒子が、新たな細胞に感染することができることを示している。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0 1 1 6】

本発明の方法により、HCVウイルス粒子を細胞培養系で作製することができる。また本発明に係る全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを導入した細胞を用いれば、全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを複製し、本発明のHCVウイルス粒子を細胞培養系で持続的に産生させることができる。本発明の全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを導入した細胞は、HCVの複製過程、ウイルス粒子形成過程、ウイルス粒子の細胞外放出過程に影響を及ぼす各種物質をスクリーニングするための試験系として利用することもできる。本発明の全長HCVレプリコンRNA及び全長HCVゲノムRNA並びにウイルス粒子は、外来遺伝子のウイルスベクターとしても有用である。本発明のウイルス粒子又はその一部はまた、C型肝炎ウイルスに対するワクチン抗原としてワクチンに含有させることができる。さらに、本発明のウイルス粒子と他の細胞とを一緒に培養する系を、ウイルス粒子の細胞への感染に影響を及ぼす各種物質をスクリーニングするための試験系として利用することができる。本発明の全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAはまた、HCVの全長ゲノム配列を容易に複製することができる鋳型としても有用である。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0 1 1 7】

【図 1】 図 1 は、本発明の全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを作製するための鋳型DNAの構築手順を示す概略図である。図 1 の上段は、T7プロモーターの下流に全長HCVゲノムを挿入して作製したプラスミドクローンpJFH1の構造を示す。図 1 の下段は、pJFH1のT7プロモーターと5'非翻訳領域の下流にネオマイシン耐性遺伝子とEMCV IRESを含むDNA断片を挿入した、全長HCVゲノム配列を含むプラスミドクローンpFJFH1の構造を示す。図中の記号は以下のとおりである。T7: T7 RNAプロモーター

ター、5'UTR: 5'非翻訳領域、C: コアタンパク質、E1、E2: エンベロープタンパク質。NS2、NS3、NS4A、NS4B、4A、4B: 非構造タンパク質。3'UTR: 3'非翻訳領域。Age I、Pme I、Xba I: 制限酵素Age I、Pme I及びXba Iの切断部位。GDD: NS5Bタンパク質の活性中心に相当するアミノ酸モチーフGDDの位置。neo: ネオマイシン耐性遺伝子、EMCV IRES: EMCV IRES (脳心筋炎ウイルスの内部リボソーム結合部位)。

【図2】図2は、全長HCVゲノムRNAであるrJFH-1を導入したHuh7細胞におけるrJFH-1の複製を示すノーザンブロット解析の結果を示す写真である。

【図3】図3は、培地中のHCVコアタンパク質の定量的結果を示す。白抜きの円はrJFH1を導入した細胞、黒塗りの円はrJFH1/GNDを導入した細胞を示す。

【図4】図4は、rJFH-1を導入したHuh7細胞の培養上清をショ糖密度勾配により分画した各画分についての、HCVコアタンパク質量及び全長HCVゲノムRNA量、並びに比重を示すグラフである。黒塗りの円はHCV コア(core)タンパク質、白抜きの円は全長HCVゲノムRNA、網掛けの円は比重を示す。

【図5】図5は、全長HCVレプリコンRNAであるrFGREP-JFH1をトランスフェクションしたHuh7細胞のコロニー形成を示す写真である。

【図6】図6は、rFGREP-JFH1のHuh7細胞へのトランスフェクションにより樹立した全長HCVレプリコンRNA複製細胞クローンにおける、全長HCVレプリコンRNAの複製を示す写真である。

【図7】図7は、ゲノムDNA中へのネオマイシン耐性遺伝子の組み込みの有無を確認するための、宿主細胞のゲノムDNAを鋳型とし、ネオマイシン耐性遺伝子特異的プライマーを用いてPCR増幅した結果を示す写真である。M: DNAサイズマーカー、P: 陽性対照、N: Huh7細胞。

【図8】図8は、全長HCVレプリコンRNAであるrFGREP-JFH1を導入したHuh7細胞におけるcoreタンパク質の発現を示すウェスタンブロット解析の結果を示す写真である。

【図9】図9は、全長HCVレプリコンRNAであるrFGREP-JFH1を導入したHuh7細胞におけるNS3タンパク質の発現を示すウェスタンブロット解析の結果を示す写真である。

【図10】図10は、全長HCVレプリコンRNAであるrFGREP-JFH1を導入したHuh7細胞におけるNS5Aタンパク質の発現を示すウェスタンブロット解析の結果を示す写真である。

【図11】図11は、rFGREP-JFH1を導入したHuh7細胞の培養上清をショ糖密度勾配により分画した各画分についての、HCV coreタンパク質量及び全長HCVレプリコンRNA量、並びに比重を示すグラフである。黒塗りの円はHCV コア(core)タンパク質、白抜きの円は全長HCVレプリコンRNA、網掛けの円は比重を示す。

【図12】図12は、全長HCVレプリコンRNA複製細胞の培養上清に含まれるウイルス粒子を添加したHuh7細胞のコロニー形成を示す写真である。

#### 【配列表フリーテキスト】

##### 【0118】

配列番号1の配列は、JFH-1クローン由来のHCVゲノムRNAの5'非翻訳領域を示す。

配列番号2の配列は、JFH-1クローン由来のHCVゲノムRNAのcoreタンパク質コード配列を示す。

配列番号3の配列は、JFH-1クローン由来のHCVゲノムRNAのE1タンパク質コード配列を示す。

配列番号4の配列は、JFH-1クローン由来のHCVゲノムRNAのE2タンパク質コード配列を示す。

配列番号5の配列は、JFH-1クローン由来のHCVゲノムRNAのNS2タンパク質コード配列を示す。

配列番号6の配列は、JFH-1クローン由来のHCVゲノムRNAのNS3タンパク質コード配列を示す。

配列番号7の配列は、JFH-1クローン由来のHCVゲノムRNAのNS4Aタンパク質コード配列を示す。

示す。

配列番号 8 の配列は、JFH-1 クローン由来の HCV ゲノム RNA の NS4B タンパク質コード配列を示す。

配列番号 9 の配列は、JFH-1 クローン由来の HCV ゲノム RNA の NS5A タンパク質コード配列を示す。

配列番号 1 0 の配列は、JFH-1 クローン由来の HCV ゲノム RNA の NS5B タンパク質コード配列を示す。

配列番号 1 1 の配列は、JFH-1 クローン由来の HCV ゲノム RNA の 3' 非翻訳領域を示す。

配列番号 1 2 の配列は、JFH-1 クローン由来の全長 HCV ゲノム RNA を示す。

配列番号 1 3 の配列は、JFH-1 クローン由来の全長 HCV ゲノム RNA を含む レプリコン RNA を示す。

配列番号 1 4 の配列は、アミノ酸モチーフ GDD を GND に変異させた、JFH-1 クローン由来の全長 HCV ゲノム RNA を示す。

配列番号 1 5 の配列は、アミノ酸モチーフ GDD を GND に変異させた、JFH-1 クローン由来の全長 HCV ゲノム RNA を含む レプリコン RNA を示す。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Toray Industries Inc.

Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research

<120> A nucleic acid construct comprising a full-length genome of human Hepatitis C virus, a recombinant cell transfected with the same replicating the full-length virus genome, and a process for producing human Hepatitis C virus particles

<130> P04-0110

<140>

<141>

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 340

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> 5' non-translated region of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<220>

<223> inventor: Wakita, Takaji

Inventor: Kato, Takanobu

Inventor: Date, Tomoko

Inventor: Miyamoto, Michiko

Inventor: Tanabe, Junichi

Inventor: Sone, Saburo

<400> 1

```
accugccccc aauaggggcg acacuccgcc augaaucau cccugugag gaacuacugu 60
cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
ccccucccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aauugccggg 180
aagacugggu ccuuucuuug auaaaccac ucuaugcccg gccauuuggg cgugcccccg 240
caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauaggg 300
cgcuugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc 340
```

<210> 2

<211> 573

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; core protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

&lt;400&gt; 2

```
augagcacia auccuaaacc ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg ucgcccagaa 60
gacguuaagu ucccgggcgg cggccagauc guuggcggag uauacuuguu gccgcgcagg 120
ggccccaggu ugggugugcg cacgacaagg aaaacuucgg agcgguccca gccacguggg 180
agacgccagc ccauccccaa agaucggcgc uccacuggca aggccugggg aaaaccaggu 240
cgccccuggc ccuauauagg gaauagaggga cucggcuggg caggauggcu ccuguccccc 300
cgaggcucuc gcccuccug gggccccacu gacccccggc auaggucgcg caacgugggu 360
aaagucaucg acaccuaac guguggcuuu gccgaccuca uggggguacau ccccgucgua 420
ggcgccccgc uuaguggcgc cgccagagcu gucgcgcacg gcgugagagu ccuggaggac 480
gggguaauu augcaacagg gaaccuaccc gguuucccu uuucuaucuu cuugcuggcc 540
cuguuguccu gcaucaccgu uccggucucu gcu 573
```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 576

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Hepatitis C virus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; E1 protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

&lt;400&gt; 3

```
gcccagguga agaauaccag uagcagcuac auggugacca augacugcuc caaugacagc 60
aucacuuggc agcucgaggc ugcgguucuc cacguccccc ggugcguccc gugcgagaga 120
guggggaaua cgucacggug uugggugcca gucucgcaa acauggcugu gcggcagccc 180
ggugcccua cgaggggucu gcggacgcac aucgauaugg uuugauguc cgccaccuuc 240
ugcucugcuc ucuacguggg ggaccucugu ggcgggguga ugcucgcggc ccagguguuc 300
aucgucucgc cgcaguacca cugguuugug caagaaugca auugcuccau cuaccuggc 360
accaucacug gacaccgcau ggcaugggac augaugauga acuggucgcc cacggccacc 420
augauccugg cguacgugau gcgcgucccc gaggucauca uagacaucgu uagcggggcu 480
cacuggggcg ucauguucgg cuuggccuac uucucuaugc agggagcgug ggcgaagguc 540
auugucaucc uucugcuggc cgcugggggug gacgcg 576
```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1290

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Hepatitis C virus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; E2 protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

&lt;400&gt; 4



```

ggcaccacca ccguuggagg cgcuguugca cguuccacca acgugauugc cggcguguuc 60
agccauggcc cucagcagaa cauucagcuc auuaacacca acggcaguug gcacaucaac 120
cguacugccu ugaauugcaa ugacuccuug aacaccggcu uucucgcggc cuuguucuac 180
accaaccgcu uuaacucguc agggugucca gggcgccugu ccgccugccg caacaucgag 240
gcuuuccgga uagggugggg caccuacag uacgaggaua augucaccaa uccagaggau 300
augaggccgu acugcuggca cuacccccca aagccgugug gcguaguccc cgcgaggucu 360
guguguggcc caguguacug uuucaccccc agcccggugag uaguggggcac gaccgacaga 420
cguggagugc ccaccuacac auggggagag aaugagacag augucuuccu acugaacagc 480
acccgaccgc cgcagggcuc augguucggc ugcacgugga ugaacuccac ugguuucacc 540
aagacuugug gcgcgccacc uugccgcacc agagcugacu ucaacgccag cacggacuug 600
uugugcccuu cggauuguuu uaggaagcau ccugaugcca cuuauauuaa gugugguucu 660
gggcccuggc ucacaccaa gugccugguc cacuacccuu acagacucug gcauuacccc 720
ugcacaguca auuuuaccuu cuucaagaua agaauguaug uaggggggggu ugagcacagg 780
cucacggccg caugcaacuu cacucguggg gaucgcugcg acuuggagga cagggacagg 840
agucagcugu cuccucuguu gcacucuacc acggaauggg ccauccugcc cugcaccuac 900
ucagacuua cccguuuguc aacuggucuu cuccaccuuc accagaacau cguggacgua 960
caauacaugu auggccucuc accugcuau acaaaauacg ucguucgaug ggagugggug 1020
guacucuua uccugcucuu agcggacgcc agagucugcg ccugcuugug gaugcucuauc 1080
uuguugggcc aggccgaagc agcauuggag aaguuggucg ucuugcacgc ugcgagugcg 1140
gcuaacugcc auggccuccu auauuuugcc aucuucucg uggcagcuug gcacaucagg 1200
ggucgggugg ucccuugac caccuauugc cucacuggcc uauggcccuu cugccuacug 1260
cucauggcac ugccccggca ggcuaaugcc 1290

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 651

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Hepatitis C virus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; NS2 protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

&lt;400&gt; 5

```

uauagacgcac cugugcacgg acagauaggc guggguuugu ugauauugau caccucuuuc 60
acacucaccc cgggguauaa gaccuccuc ggccaguguc uguggugguu gugcuauuc 120
cugaccucgg gggaagccau gauucaggag uggguaccac ccaugcaggu gcgcggcggc 180
cgcgauggca ucgcgugggc cgucacuaua uucugcccgg gugugguguu ugacauuacc 240
aaauggcuuu uggcguugcu ugggccugcu uaccucuuaa gggccgcuuu gacacaugug 300
ccguacuucg ucagagcuca cgcucugaua aggguaugcg cuuuggugaa gcagcucgcg 360
ggggguaggu auguucaggu ggcgcuaauug gcccuuggca gguggacugg caccuacau 420
uauagaccac ucacaccuau gucggacugg gccgcuaagcg gccugcgcga cuuagcgguc 480
gccguggaac ccaucaucuu caguccgaug gagaagaagg ucaucgucug gggagcggag 540
acggcugcau guggggacau ucuacaugga cuucccgugu ccgcccga cuuagcaggag 600
auccuccucg gccagcuga ugguacacac uccaaggggu ggaagcuccu u 651

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 1893

&lt;212&gt; RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> NS3 protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 6

```
gcucccauca cugcuuauhc ccagcaaaca cgaggccucc ugaggcgccau aguggugagu 60
augacggggc gugacaggac agaacaggcc ggggaagucc aaauccuguc cacagucucu 120
caguccuucc ucggaacaac caucucgggg guuuugugga cuguuuacca cggagcuggc 180
aacaagacuc uagccggcuu acgggguccg gucacgcaga uguacucgag ugcugagggg 240
gacuugguag gcuggcccag ccccccuggg accaagucuu ugagagccgug caagugugga 300
gccgucgacc uauaucuggu cacgcggaac gcugauguca ucccggcucg gagacgcggg 360
gacaagcggg gagcauugcu cucccccaga cccauuucga ccuugaaggg guccucgggg 420
ggggccggugc ucugcccuag gggccacguc guugggcucu uccgagcagc ugugugcucu 480
cggggcgugg ccaaauccau cgauuucalc cccguugaga cacucgacgu uguuacaagg 540
ucucccacuu ucagugacaa cagcacgcca ccggcugugc cccagaccua ucaggucggg 600
uacuugcaug cuccaacugg caguggaaag agcaccaagg uccugucgc guaugccgcc 660
cagggguaca aaguacuagu guuaacccc ucgguagcug ccaccuagg guuuggggcg 720
uaccuaucca aggcacaugg caucaauccc aacauuagga cuggagucag gaccgugaug 780
accggggagg ccaucacgua cuccacauau ggcaaauuuc ucgccgaugg gggcugcgcu 840
agcggcgccu augacaucau cauauhcga gaaugccacg cuguggaugc uaccuccauu 900
cucggcaucg gaacgguccu ugaucagca gagacagccg gggucagacu aacugugcug 960
guacggcca cccccccg gucagugaca acccccac ccgaauaga agagguaggc 1020
cucggggcggg agggugagau ccccuucuu gggagggcg uucccuau cugcaucaag 1080
ggagggagac accugauuuu cugccacua aagaaaaagu gugacgagcu cgcggcggcc 1140
cuucggggca ugggcuugaa ugccguggca uacuauagag gguuggacgu cuccauaaua 1200
ccagcucagg gagauguggu ggucgucgcc accgacgccc ucaugacggg guacacugga 1260
gacuugacu ccgugaucga cugcaaugua gcggucaccc aagcugucga cuucagccug 1320
gaccccaccu ucacuauaac cacacagacu gucccacaag acgcugucuc acgcagucag 1380
cgccgcgggc gcacagguag aggaagacag ggcacuuaua gguauguuuc cacuggugaa 1440
cgagccucag gaauguuuga caguguagug cuuugugagu guacgacgc aggggcugcg 1500
ugguacgauc ucacaccagc ggagaccacc gucaggcuua gagcguauuu caacacgccc 1560
ggccuacccg ugugucaaga ccaucuugaa uuuugggagg caguuuucac cggccucaca 1620
cacauagacg cccacuuccu cucccaaaca aagcaagcgg gggagaacuu cgcguaccua 1680
guagccuacc aagcuacggg gucgccaga gccaaaggccc cucccccguc cugggacgcc 1740
auguggaagu gccuggccc acucaagccu acgcuugcgg gcccacacc ucuccuguac 1800
cguuugggcc cuauuaccaa ugaggucacc cucacacacc cugggacgaa guacaucgcc 1860
acaugcaugc aagcugaccu ugaggucaug acc 1893
```

<210> 7

<211> 162

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> NS4A protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

&lt;400&gt; 7

agcacguggg uccuagcugg aggaguccug gcagccgucg ccgcauauug ccuggcgacu 60  
ggaugcguuu ccaucaucgg ccgcuugcac gucaaccagc gagucgucgu ugcgccggau 120  
aaggaggucc uguaugaggc uuuugaugag auggaggaau gc 162

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 783

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Hepatitis C virus

&lt;220&gt;

<223> NS4B protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived  
from JFH-1 clone

&lt;400&gt; 8

gccucuaggg cggcucucau cgaagagggg cagcggauag ccgagauguu gaaguccaag 60  
auccaaggcu ugcugcagca ggccucuaag caggcccagg acauacaacc cgcuaugcag 120  
gcuucauggc ccaaagugga acaauuuugg gccagacaca uguggaacuu cauagcggc 180  
auccaauacc ugcaggaau gucaacacug ccagggaacc ccgcgguggc uuccaugaug 240  
gcauucagug ccgcccucac caguccguug ugcaccagua ccaccauccu ucucaacauc 300  
augggaggcu gguuagcguc ccagaucgca ccacccgcgg gggccaccgg cuuugucguc 360  
aguggccugg ugggggcguc cgugggcagc auaggccugg guaaggugcu gguggacauc 420  
cuggcaggau auggucggg cauuucgggg gccucgucg cauucaagau caugucuggc 480  
gagaagcccu cuauggaaga ugucaucaau cuacugccug ggauccuguc uccgggagcc 540  
cugguggugg gggucaucug cgcggccauu cugcgccgcc acgugggacc gggggagggc 600  
gcgguccaau ggaugaacag gcuuauugcc uuugcuucca gaggaacca cgucgccccu 660  
acucacuacg ugacggaguc ggaugcgucg cagcguguga cccaacuacu uggcucucuu 720  
acuauaacca gccuacucag aagacuccac aauggauaa cugaggacug ccccauccca 780  
ugc 783

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1398

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Hepatitis C virus

&lt;220&gt;

<223> NS5A protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived  
from JFH-1 clone

&lt;400&gt; 9

uccggauccu ggcuccgcga cgugugggac ugguuuugca ccaucuugac agacucaaa 60  
aaugggcuga ccucuaaau guuccccaag cugcccggcc ucccuucau cucuugucua 120  
aaggguuaca agggugugug ggccggcacu ggcaucauga ccacgcgcug ccuugcggc 180  
gccaacau cuaggcaaugi ccgccugggc ucuauagga ucacagggcc uaaaaccugc 240  
augaacaccu ggcaggggac cuuuccuauc aaugcuaca cggagggccca gugcgcgccg 300  
aaacccccca cgaacuacaa gaccgccauc uggaggguug cggccucgga guacgcggag 360  
gugacgcagc augggucgua cuccuaugua acaggacuga ccacugacaa ucugaaaau 420  
ccuugccaac uaccuucucc agaguuuuuc uccuggguug acggugugca gauccauagg 480



```

uuugcaccca caccaaagcc guuuuuccgg gaugaggucu cguucugcgu ugggcuuaau 540
uccuaugcug ucggguccca gcuucccugu gaaccugagc ccgacgcaga cguauugagg 600
uccaugcuaa cagaucggcc ccacaucacg gcggagacug cggcgcgggc cuuggcacgg 660
ggauaccuc caucugaggc gaguccuca gugagccagc uaucagcacc gucgcugcgg 720
gccaccugca ccaccacag caacaccuau gacguggaca uggucgaugc caaccugcuc 780
auggagggcg guguggcuca gacagagccu gaguccaggg ugcccguucu ggacuuucuc 840
gagccaaugg ccgaggaaga gagcgaccuu gagcccucaa uaccaucgga gugcaugcuc 900
cccaggagcg gguuuccacg ggccuuaccg gcuugggcac ggccugacua caaccgccc 960
cucguggaau cguggaggag gccagauuac caaccgccc ccguugcugg uugugcucuc 1020
cccccccca agaaggcccc gacgccucc ccaaggagac gccggacagu gggucugagc 1080
gagagcacca uaucagaagc ccuccagcaa cuggccauca agaccuuugg ccagcccccc 1140
ucgagcggug augcaggcuc guccacgggg gcgggcgccg ccgaauccgg cgguccgacg 1200
ucccugggug agccggcccc cucagagaca gguuccgccu ccucuaugcc ccccucgag 1260
ggggagccug gagauccgga ccuggagucu gaucagguag agcuucaacc uccccccag 1320
gggggggggg uagcucccgg uucgggcucg gggucuuggu cuacuugcuc cgaggaggac 1380
gauaccaccg ugugcugc 1398

```

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 1773

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Hepatitis C virus

&lt;220&gt;

<223> NS5B protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

&lt;400&gt; 10

```

uccaugucau acuccuggac cggggcucua auaacucccu guagccccga agaggaaaag 60
uugccaauca acccuuugag uaacucgcug uugcgauacc auaacaaggu guacuguaca 120
acaucaaaga gcgccucaca gagggcuaaa aagguaacuu uugacaggac gcaaugcuc 180
gacgcccauu augacucagu cuuaaaggac aucaagcuag cggcuuccaa ggucagcgca 240
aggcuccuca ccuuggagga ggcgugccag uugacuccac ccauucugc aagauccaag 300
uauggauucg gggccaagga gguccgcagc uuguccggga gggccguuaa ccacaucaag 360
uccgugugga aggaccuccu ggaagaccca caaacaccaa uucccacaac caucauggcc 420
aaaaaugagg uguucugcgu ggaccccgcc aaggggggua agaaaccagc ucgccucauc 480
guuuaccug accucggcgu ccgggucugc gagaaaugg cccucuauga cauuaacaa 540
aagcuuccuc aggcgguaau gggagcuucc uauggcuucc aguacuccc ugccaacgg 600
guggaguau ucuugaaagc augggcgga aagaaggacc ccauggguu uucguaugau 660
accgaugcu ucgacucaac cgucacugag agagacauca ggaccgagga guccauauac 720
caggccugcu cccugcccga ggaggccgc acugccauac acucgcugac ugagagacuu 780
uacguaggag ggccauguu caacagcaag ggucaaaccu gcgguuacag acguugccgc 840
gccagcgggg ugcuaaccac uagcaugggu aacaccauca caugcuauu gaaagcccua 900
gcggccugca aggcugcggg gauaguugcg cccacaugc ugguaugcgg cgaugaccua 960
guagucaucu cagaaagcca ggggacugag gaggacgagc ggaaccugag agccuucacg 1020
gaggccauga ccagguacuc ugccccuccu ggugaucucc ccagaccgga auaugaccug 1080
gagcuauaa cauccuguuc cuaaaugug ucuguggcgu ugggcccgcg gggccgccgc 1140
agauacuacc ugaccagaga cccaaccacu ccacucgccc gggcugccug ggaaacaguu 1200
agacacucc cuaucaauuc auggcuggga aacaucaucc aguaugcucc aaccuauagg 1260
guucgcaugg uccuaaugac acacuucuc uccauucua ugguccaaga caccuggac 1320

```

```

cagaaccuca acuuugagau guauggauca guauacuccg ugaauccuuu ggaccuucca 1380
gccauaaauug agagguuaca cgggcuugac gccuuuucua ugcacacaua cucucaccac 1440
gaacugacgc ggguggcuuc agccucaga aaacuugggg cgccaccccu caggguugg 1500
aagagucggg cucgcgcagu cagggcgucc cucaucucc guggaggga agcggccguu 1560
ugcggccgau aucucucaa uugggcggug aagaccaagc ucaaacucac uccauugccg 1620
gagggcgccc uacuggacuu auccaguugg uucaccgucg gcgccggcgg gggcgacauu 1680
uuucacagcg ugucgcgcgc ccgaccccg c ucauuacucu ucggccuacu ccuacuuuuc 1740
guagggguag gccucuuccu acuccccgcu cgg 1773

```

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 239

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Hepatitis C virus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 3' non-translated region of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

&lt;400&gt; 11

```

uagagcggca cacacuaggu acacuccaua gcuaacuguu ccuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu ccucuuucu ucccuucuca 120
ucuuauucua cuuucuuucu ugguggcucc aucuuagccc uagucacggc uagcugugaa 180
agguccguga gccgcaugac ugcagagagu gccguaacug gucucucugc agaUCAUGU 239

```

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 9707

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Hepatitis C virus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; full-length Hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

&lt;400&gt; 12

```

gaauucuaau acgacucacu auagaccugc ccuaauagg ggcgacacuc cgccaugaau 60
cacucccug ugaggaacua cugucuucac gcagaaagcg ccuagccaug gcguuaguau 120
gagugucgua cagccuccag gcccccccu cccgggagag ccuaguggu cugcggaacc 180
ggugaguaca ccggaauugc cgggaagacu ggguccuuu uuggauaaac ccacucuaug 240
cccggccauu ugggcgugcc cccgcaagac ugcuaagccga guagcguugg guugcgaaag 300
gccuuguggu acugccugau agggcgcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug 360
caccaugagc acaaauccua aaccucaaa gaaaaccaa agaaacacca accgucgccc 420
agaagacguu aaguucccg ggcggcgcca gaucguuggc ggaguauacu uguugccgcg 480
caggggcccc agguugggug ugcgcacgac aaggaaaacu ucggagcggg cccagccacg 540
ugggagacgc cagcccaucc ccaaagaucg gcgcuccacu ggcaaggccu ggggaaaacc 600
aggucgcccc uggcccuau augggaauga gggacucggc ugggcaggau ggcuccuguc 660
ccccgaggc ucucgccccu ccuggggccc cacugacccc cggcauaggu cgcgcaacgu 720
ggguaaaguc aucgacaccc uaacgugugg cuuugccgac cucauggggg acauccccgu 780
cguaggcgcc ccgcuuagug gcgccgccag agcugucgcg cacggcguga gaguccugga 840
ggacgggguu aaauaugcaa cagggaaccu acccgguuuc ccuuuuucua ucuucuugcu 900

```

ggcccuguug uccugcauca ccguuccggu cucugcugcc caggugaaga auaccaguag 960  
 cagcuacaug gugaccaaug acugcuccaa ugacagcauc acuuggcagc ucgaggcugc 1020  
 gguucuccac guccccgggu gcgucccugug cgagagagug gggauuacgu cacgguguug 1080  
 ggugccaguc ucgccaaaca uggcugugcg gcagcccggg gccucacgc agggucugcg 1140  
 gacgcacauc gauaugguug ugauguccgc caccuucugc ucugcucucu acguggggga 1200  
 ccucuguggc ggggugaugc ucgcggccca gguguucauc gucucgccgc aguaccacug 1260  
 guuugugcaa gaaugcaauu gcuccaucua ccugggcacc aucacuggac accgcauggc 1320  
 augggacaug augaugaacu ggucgcccac ggccaccaug auccuggcgu acgugaugcg 1380  
 cgucggcgag gucaucauag acaucguuag cgggggcucac uggggcgua uguucggcuu 1440  
 ggccuacuuc ucuaugcagg gagcgugggc gaaggucuu gucauccuuc ugcuggccgc 1500  
 ugggguggac gcgggcacca ccaccguugg aggcgcuguu gcacguucca ccaacgugau 1560  
 ugccggcgug uucagccaug gccucagca gaacauucag cucauuaaca ccaacggcag 1620  
 uuggcacauc aaccguacug ccuugaauug caaugacucc uugaacaccg gcuuucucgc 1680  
 ggccuuguuc uacaccaacc gcuuaaacuc gucaggguu ccagggcgcg uguccgccug 1740  
 ccgcaacauc gaggcuuucc ggauaggguu gggcaccua caguacgagg auaugucac 1800  
 caauccagag gauaugaggc cguacugcug gcacuacccc ccaaagccgu guggcguagu 1860  
 ccccgcgagg ucugugugug gccagugua cuguuucacc cccagcccgg uaguaguggg 1920  
 cacgaccgac agacguggag ugcccaccua ccaugggga gagaugaga cagaugucu 1980  
 ccuacugaac agcaccgac cgccgcaggg cucaugguu ggcugcacgu ggaugaacuc 2040  
 cacugguuuc accaagacu uggcgcgcc accuugccgc accagagcug acuucaacgc 2100  
 cagcacggac uuguugucc cuacggauu uuuuaggaag cauccugaug ccacuauau 2160  
 uaaguguggu ucugggccc ggucacacc aaagugccug guccacuacc cuuacagacu 2220  
 cuggcauac ccugcacag ucauuuuac caucucaag auagaugu auguagggg 2280  
 gguugagcac aggcucacgg ccgcaugcaa cuucacucgu ggggaucgu gcgacuugga 2340  
 ggacagggac aggagucagc ugucuccucu guugcacucu accacggaau gggccauccu 2400  
 gccugcacc uacucagacu uaccgcuuu gucaacuggu cuucuccacc uucaccagaa 2460  
 caucguggac guacaauaca uguauggccu cucaccugcu aucacaaaau acgucguucg 2520  
 augggagugg gugguacucu uauuccugcu cuuagcggac gccagagucu gcgccugcuu 2580  
 guggaugcuc aucuuguugg gccaggccga agcagcauug gagaaguugg ucgucuugca 2640  
 cgcugcgagu gcggcuacu gccaugccu ccuauuuuu gccaucuuc ucguggcagc 2700  
 uuggcacauc aggggucggg uggucccuu gaccaccuau ugccucacug gccuauggcc 2760  
 cuucugccua cugcucaugg cacugccccg gcaggcuuau gccuauagc caccugugca 2820  
 cggacagaua ggcguggguu uguugauuu gaucaccuc uucacacuca cccggggua 2880  
 uaagaccuc cucggccagu gucuguggug guugugcuau cuccugacc ugagggaagc 2940  
 caugauucag gaguggguac caccuagca ggugcgcg gcgcgcaug gcaucgcgug 3000  
 ggccgucacu auauucugcc cggguguggu guuugacau accaaauggc uuuuggcguu 3060  
 gcuugggccu gcuuaccucu uaagggccgc uuugacacau gugccguacu ucgucagagc 3120  
 ucacgcucug auuaggguau gcgcuuuggu gaagcagcuc gcggggggua gguauguua 3180  
 gguggcgcua uuggcccuug gcagguggac uggcaccuac aucuauagc accucacacc 3240  
 uaugucggac ugggcccua gcggccugcg cgacuagcg gucgccgugg aaccacau 3300  
 cuucaguccg auggagaaga aggucaucgu cuggggagcg gagacggcug caugugggga 3360  
 cauucuaau ggacuucccg ugucccccg acucggccag gagaucucc ucggcccagc 3420  
 ugauggcuac accuccaagg gguggaagcu ccuugcucc aucacugcu augcccagca 3480  
 aacacgaggc cuccugggcg ccuauuggu gaguagacg gggcgugaca ggacagaaca 3540  
 ggccggggaa guccaaaucc uguccacagu cucucagucc uuccucggaa caaccuuc 3600  
 ggggguuuug uggacuguu accacggagc uggcaacaag acucuagccg gcuuacgggg 3660  
 uccggucacg cagauguacu cgagugcuga gggggacuug guaggcuggc ccagcccccc 3720  
 ugggaccaag ucuuuggagc cgugcaagug uggagccguc gaccuauauc uggucacgcg 3780  
 gaacgcugau gucaucccg cucggagacg cggggacaag cggggagcau ugcucucccc 3840  
 gagaccuau ucgaccuuga agggguccuc gggggggccg ggcucugcc cuaggggcca 3900



cgucguuggg cucuuccgag cagcugugug cucucggggc guggccaaau ccaucgauuu 3960  
 cauccccguu gagacacucg acguuguuac aaggucuccc acuuucagug acaacagcac 4020  
 gccaccggcu guggcccaaga ccuauaggu cggguacuug caugcuccaa cuggcagugg 4080  
 aaagagcacc aagguccug ucgcguaugc cgcccagggg uacaaaguac uagugcuuaa 4140  
 cccucggua gcugccaccc ugaggguugg ggcguaccua uccaaggcac auggcauca 4200  
 uccaacauu aggacuggag ucaggaccgu gaugaccggg gaggccauc cguacuccac 4260  
 auauggcaaa uuucucgccg augggggcug cgcuagcggc gccuagaca ucaucauug 4320  
 cgaugaugc cacgcugugg augcuaccuc cauucucggc aucggaacgg uccuugauca 4380  
 agcagagaca gccggggua gacuaacugu gcuggcuacg gccacacccc ccgggucagu 4440  
 gacaaccccc caucccgaua uagaagaggu agggcucggg cgggagggug agaucccuu 4500  
 cuaugggagg gcgauuccc uauccugcau caaggaggagg agacaccuga uuuucugcca 4560  
 cucaaagaaa aagugugacg agcucgcggc ggcccuucgg ggcaugggcu ugaugccgu 4620  
 ggcauacuau agaggguugg acgucuccau aaauaccagcu caggagaug ugguggucgu 4680  
 cgccaccgac gcccucauga cggggguacac uggagacuuu gacuccguga ucgacugcaa 4740  
 uguagcgguc acccaagcug ucgacuucag ccuggacccc accuucacua uaaccacaca 4800  
 gacugucca caagacgcug ucucacgcag ucagcggcg gggcgcacag guagaggaag 4860  
 acagggcacu uauagguaug uuuccacugg ugaacgagcc ucaggaaugu uugacagugu 4920  
 agugcuuugu gagugcuacg acgcaggggc ugcgugguac gaucucacac cagcggagac 4980  
 caccgucagg cuuagagcgu auuuaacac gcccggccua cccguguguc aagaccauc 5040  
 ugaauuuugg gaggcaguuu ucaccggccu cacacacaua gacgccacu uccucucca 5100  
 aacaaagcaa gcgggggaga acuucgcgua ccuaguagcc uaccaagcua cggugugcg 5160  
 cagagccaag gcccucccc cguccuggga cgccaugugg aagugccugg cccgacuaa 5220  
 gccuacgcuu gcggggccca caccucuccu guaccguuug ggcccuauua ccaugaggu 5280  
 caccucaca caccuggga cgaaguacau cgccacaugc augcaagcug accuugaggu 5340  
 caugaccagc acgugggucc uagcuggagg aguccuggca gccgucgccg cauauugcu 5400  
 ggcgacugga ugcguuucca ucaucggccg cuugcacguc aaccagcgag ucgucguugc 5460  
 gccggauaag gagguccugu augaggcuu ugaugagaug gaggaugcg ccucuagggc 5520  
 ggcucucauc gaagaggggc agcggaugc cgagauguug aaguccaaga uccaaggcu 5580  
 gcugcagcag gccucuaagc agggccagga cauacaacc gcuaugcagg cuucauggcc 5640  
 caaaguggaa caauuuuggg ccagacacau guggaacuuc auuagcggca uccaauaccu 5700  
 cgcaggauug ucaacacugc cagggaacc cgcgguuggu uccaugaug cauucagugc 5760  
 cgccucacc aguccguugu cgaccaguac caccuuccu cucaacaua ugggaggcug 5820  
 guuagcgucc cagaucgcac caccgcggg ggccaccggc uuugucguc guggccuggu 5880  
 gggggcugcc gugggcagca uaggccuggg uaaggugcug guggacauc uggcaggaua 5940  
 uggugcgggc auuucggggg ccucgucgc auucaagau augucggcg agaagcccuc 6000  
 uauuggaagau gucaucauac uacugccugg gaucugucu ccgggagccc uggugguggg 6060  
 ggucaucugc gcggccauuc ugcgccgcca cgugggaccg ggggagggcg cgguccaau 6120  
 gaugaacagg cuuauugcu uuucuccag aggaaccac gucgcccuca cucacuacgu 6180  
 gacggagucg gaugcugcgc agcgugugac ccaacuacuu ggcucucuua cuauaaccag 6240  
 ccuacucaga agacuccaca auuggauaac ugaggacug cccaucccau gcuccggauc 6300  
 cuggcuccgc gacguguggg acuggguuug caccuucug acagacuua aaaauuggcu 6360  
 gaccucuaaa uuuuuccca agcugcccgg ccucccuuc aucucuuguc aaaagggua 6420  
 caaggguug ugggccggca cuggcaucau gaccacgcgc ugcccuugcg gcgccaacau 6480  
 cucuggcaau guccgccugg gcucuaugag gaucacagg ccuaaaaccu gcaugaacac 6540  
 cuggcagggg accuuuccua ucaauugcu cacggagggc cagugcgcgc cgaaaccccc 6600  
 cacgaacuac aagaccgcca ucuggagggu ggcggccucg gaguacgcgg agguagcga 6660  
 gcaugggucg uacuccuau uaacaggacu gaccacugac aaucugaaa uuccuugcca 6720  
 acuaccuuc ccagaguuu ucuccugggu ggacggugug cagauccaua gguuugcacc 6780  
 cacaccaaag ccguuuuucc gggaugaggu cucguucug guugggcuua auuccuugc 6840  
 ugucgggucc cagcuuccu gugaaccuga gcccgacgca gacguauuga gguccaugcu 6900

aacagaucgg cccacauca cggcggagac ugcggcgcgg cgcuuggcac ggggaucacc 6960  
 uccaucugag gcgagcuccu cagugagcca gcuaucagca ccgucgcugc gggccaccug 7020  
 caccaccac agcaacaccu augacgugga cauggucgau gccaaccugc ucauggaggg 7080  
 cgguguggcu cagacagagc cugaguccag ggugcccguu cuggacuuc ucgagccaau 7140  
 ggccgaggaa gagagcgacc uugagcccuc aaauaccaucg gagugcaugc ucccaggag 7200  
 cggguuucca cgggccuac cggcuugggc acggccugac uacaaccgc cgcucgugga 7260  
 aucguggagg aggccagauu accaaccgcc caccguugcu gguugugcuc uccccccc 7320  
 caagaaggcc ccgacgccuc cccaaggag acgccggaca gugggucuga gcgagagcac 7380  
 cauaucagaa gccuccagc aacuggccau caagaccuuu ggccagcccc ccucgagcgg 7440  
 ugaugcaggc ucguccacgg gggcgggcgc cgccgaaucc ggcgguccga cgucccugg 7500  
 ugagccggcc ccucagaga cagguuccgc cuccucuaug cccccccugc agggggagcc 7560  
 uggagaucgg gaccuggagu cugaucaggu agagcucaa ccucccccc aggggggggg 7620  
 gguagcucc ggucgggcu cggggucuuu gucuacuugc uccgaggagg acgauaccac 7680  
 cgugugcugc uccaugucau acuccuggac cggggcucua auaacuccu guagccccga 7740  
 agaggaaaag uugccaauca acccuuugag uaacucgcug uugcgauacc auaacaaggu 7800  
 guacuguaca acaucaaaaga gcgccucaca gagggcuaaa aagguaacu uugacaggac 7860  
 gcaagugcuc gacgcccau augacucagu cuuaaaggac aucaagcuag cggcuuccaa 7920  
 ggucagcgcga aggcuccuca ccuuggagga ggcgugccag uugacuccac ccuucugc 7980  
 aagauccaag uauggauucg gggccaagga gguccgcagc uuguccggga gggccguuaa 8040  
 ccacaucaag uccgugugga aggaccuccu ggaagacca caaacacca uuccacaac 8100  
 caucauggcc aaaaugagg uguucugcgu ggaccccgcc aaggggggua agaaaccagc 8160  
 ucgccucauc guuuaccug accucggcgu ccgggucugc gagaaaugg ccucuauga 8220  
 cauuacacaa aagcuuccuc aggcgguaau gggagcuucc uauggcuucc aguacuccc 8280  
 ugcccaacgg guggaguauc ucuugaaagc augggcgga aagaaggacc ccauggguu 8340  
 uucguaugau acccgauuc ucgacucaac cgucacugag agagacauca ggaccgagga 8400  
 guccauauac caggccugcu ccugccccga ggaggccgc acugccauac acucgcugac 8460  
 ugagagacuu uacguaggag ggccauguu caacagcaag ggucaaaccu gcgguuacag 8520  
 acguugccgc gccagcgggg ucuaaccac uagcaugggu aacaccauca caugcuauu 8580  
 gaaagcccua gcggccugca aggcugcggg gauaguugcg cccacaugc ugguaugcgg 8640  
 cgaugaccua guagucauc cagaaagcca ggggacugag gaggacgagc ggaaccugag 8700  
 agccuucacg gaggccauga ccagguacuc ugcccuccu ggugaucucc ccagaccgga 8760  
 auaugaccug gagcuauaa cauccuguuc cucaaauug ucuguggcgu ugggcccgcg 8820  
 gggccgcccgc agauacuacc ugaccagaga cccaaccacu ccacucgcc gggcugccug 8880  
 ggaaacaguu agacacucc cuaucaauuc auggcuggga acaucaucc aguaugcucc 8940  
 aaccuauagg guucgcaugg uccuauagac acacuucuc uccauucua ugguccaaga 9000  
 caccucggac cagaaccuca acuuugagau guauggauc guauacucc ugaauccuu 9060  
 ggaccuucca gccauauug agagguuaca cgggcuugac gccuuuucua ugcacacua 9120  
 cucucaccac gaacugacgc ggguggcuuc agcccucaga aaacuugggg cgccaccucc 9180  
 caggguugg aagagucggg cucgcgcagu cagggcgucc cucaucucc guggaggga 9240  
 agcggccguu ugcggccgau aucucucaa uugggcggug aagaccaagc ucaaacucac 9300  
 uccauugccg gaggcgcgcc uacuggacu auccaguugg uucaccguc gcgcccggcg 9360  
 gggcgacauu uuucacagcg ugucgcgcgc ccgacccgc ucauuacuc ucggccuacu 9420  
 ccuacuuuuc guagggguag gccucuucc acuccccgc cgguagagcg gcacacacua 9480  
 gguacacucc auagcuacu guuccuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu 9540  
 uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuccucuu ucuuuccuuc ucaucuuuu cuacuucuu 9600  
 ucuugguggc uccaucuuag ccuagucac ggcuagcugu gaaaggucc ugagccgcau 9660  
 gacugcagag agugccguua cuggucucuc ugcagaucuu gucuaga 9707



&lt;211&gt; 11111

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: replicon RNA comprising full-length Hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

&lt;400&gt; 13

```
accugccccc aauaggggac acacuccgcc augaaucacu cccugugag gaacuacugu 60
cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
ccccucccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aaugccggg 180
aagacugggu ccuuucuugg auaaaccac ucuaugcccg gccauuuggg cgugcccccg 240
caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauaggg 300
cgcuugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc augagcaca auccuaaacc 360
ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg ucgcccuaug auugaacaag auggauugca 420
cgagguucu ccggccgcuu ggguggagag gcuaucggc uaugacuggg cacaacagac 480
aaucggcugc ucugaugccg ccguguuccg gcugucagcg caggggcgcc cgguuuuuu 540
ugucaagacc gaccuguccg gugcccugaa ugaacugcag gacgaggcag cgcggcuau 600
guggcuggcc acgacgggac uuccuugcgc agcugugcuc gacguuguca cugaagcggg 660
aagggacugg cugcuauugg gcgaagugcc ggggcaggau cuccugucau cucaccuugc 720
uccugccgag aaaguaacca ucauggcuga ugcaaugcgg cggcugcaua cgcuugauc 780
ggcuaccugc ccuucgacc accaagcgaa acaucgcauc gagcgagcac guacucggau 840
ggaagccggu cuugucgauc aggaugaucu ggacgaagag caucaggggc ucgcgccagc 900
cgaacuguuc gccaggcuca aggcgcgcua gcccgacggc gaggaucucg ucgugacca 960
uggcgaugcc ugcuuuccga auaucauggu ggaaauggc cgcuuuucug gauucaucga 1020
cuguggccgg cugggugugg cggaccgcuu ucaggacaua gcguuggcuu cccgugauau 1080
ugcugaagag cuuggcggcg aaugggcuga ccgcuuccuc gugcuuuacg guaucgccgc 1140
ucccgauucg cagcgcaucg ccuucuaucg ccuucuuugac gaguucuuu gaguuuaaac 1200
ccucuccuc ccccccccu aacguuacug gccgaagccg cuuggaauaa ggccggugug 1260
cguuugucua uauguuuuu uccaccuauu ugccgucuuu uggcaaugug agggcccggg 1320
aaccuggccc ugucuucuu acgagcauuc cuaggggucu uuccccucuc gccaaaggaa 1380
ugcaaggucu guugaauguc gugaaggag caguuccucu ggaagcuuc ugaagacaaa 1440
caacgucugu agcgaccuu ugcaggcagc ggaaccccc accuggcgac agguccucu 1500
gcggccaaaa gccacgugua uaagauacac cugcaaaggc ggcacaacc cagugccacg 1560
uugugaguug gauaguugug gaaagaguca aauggcucuc cucaagcgua uucaacaagg 1620
ggcugaagga ugcccagaag guaccccau guaugggauc ugaucugggg ccucggugca 1680
caugcuuuac auguguuuag ucgagguuaa aaaaacgucu agggcccccg aaccacgggg 1740
acgugguuuu ccuuugaaaa acacgaugau accaugagca caauccuaa accucaaaga 1800
aaaacaaaa gaaacaccaa ccgucgcca gaagacguua aguucccggg cggcggccag 1860
aucguuggcg gaguauacuu guugccgcgc aggggccccca gguugggugu gcgcacgaca 1920
aggaaaacuu cggagcgguc ccagccacgu gggagacgcc agcccaucc caaagaucgg 1980
cgcuccacug gcaaggccug gggaaaacca ggucgccccu ggccccuaua ugggaaugag 2040
ggacucggcu gggcaggau gcuccugucc cccgaggcu cucgcccuc cuggggcccc 2100
acugaccccc ggcauagguc gcgcaacgug gguaaaguca ucgacaccu aacguguggc 2160
uuugccgacc ucauggggua cauccccguc guaggcgccc cgcuuagugg cggcgccaga 2220
gcugucgcgc acggcgugag aguccuggag gacggggua auuaugcaac agggaaaccua 2280
cccgguuucc ccuuuucua cuucuuugc gcccuguugu ccugcaucac cguuccgguc 2340
ucugcugccc aggugaagaa uaccaguagc agcuacaugg ugaccaauga cugcucaau 2400
gacagcauca cuuggcagcu cgaggcugcg guucuccacg uccccgggug cgucccguc 2460
```

gagagagugg ggaauacguc acgguguugg gugccagucu cgccaaacau ggcugugcgg 2520  
 cagcccggug ccucacgca gggucugcgg acgcacaucg auaugguugu gauguccgcc 2580  
 accuucugcu cugcucucua cgugggggac cucuguggcg gggugaugcu cgcggcccag 2640  
 guguucaucg ucucgccgca guaccacugg uuugugcaag aaugcaauug cuccaucua 2700  
 ccuggcacca ucacuggaca ccgcauggca ugggacauga ugaugaacug gucggccacg 2760  
 gccaccauga uccuggcgua cgugaugcgc gucccccagg ucaucauaga caucguuagc 2820  
 ggggcucacu ggggcgucua guucggcuug gccuacuucu cuaugcaggg agcgugggcg 2880  
 aaggucuuug ucauccuucu gcuggccgcg gggguggacg cgggcaccac caccguugga 2940  
 ggcgcuguug cacguuccac caacgugauu gccggcgugu ucagccaugg ccucagcag 3000  
 aacauucagc ucauuacac caacggcagu uggcacauc accguacugc cuugaauugc 3060  
 aaugacuccu ugaacaccgg cuuucucgcg gccuuguucu acaccaaccg cuuuacucg 3120  
 ucaggguugc cagggcgccu guccgccugc cgcaacauc aggcuuuccg gauagggugg 3180  
 ggcacccuac aguacgagga uaaugucacc aaucagagg auaugaggcc guacugcugg 3240  
 cacuaccccc caaagccgug uggcguaguc cccgcgaggu cugugugugg cccaguguac 3300  
 uguuucaccc ccagcccggg aguagugggc acgaccgaca gacguggagu gccaccuac 3360  
 acauggggag agaaugagac agaugucuuc cuacugaaca gcacccgacc gccgcagggc 3420  
 ucaugguucg gcugcacgug gaugaacucc acugguuua ccaagacuug uggcgcgcca 3480  
 ccuugccgca ccagagcuga cuucaacgcc agcacggacu uguugugccc uacggauugu 3540  
 uuugaggaagc auccugaugc cacuuauuu aagugugguu cugggcccug gcucacacca 3600  
 aagugccugg uccacuaccc uuacagacuc uggaauuacc ccugcacagu caauuuuacc 3660  
 aucuuaaga uaagaugua uguagggggg guugagcaca ggcucacggc cgcaugcaac 3720  
 uucacucgug gggaucgcug cgacuuggag gacagggaca ggagucagcu gucuccucug 3780  
 uugcacucua ccacggaug ggccaucug cccugcaccu acucagacuu acccgcuug 3840  
 ucaacugguc uucuccaccu ucaccagaac aucguggacg uacaauacau guauggccuc 3900  
 ucaccugcua ucacaaaaua cgucguucga ugggaguggg ugguacucuu auuccugcuc 3960  
 uuagcggacg ccagagucug cgccugcuug uggaugcua ucuuguuggg ccaggccgaa 4020  
 gcagcauugg agaaguuggu cgucuugcac gcugcgagug cggcuaacug ccauggccuc 4080  
 cuauauuuug ccaucuucu cguggcagcu uggcacauc ggggucgggu ggucuccuug 4140  
 accaccuauu gccucacugg ccuauggccc uucugccuac ugcucauggc acugccccgg 4200  
 caggcuuauu ccuauagcgc accugugcac ggacagauag gcguggguuu guugauauug 4260  
 aucaccucuc ucacacucac cccggggauu aagaccucc ucggccagug ucuguggugg 4320  
 uuugcuauc uccugacccu gggggaagcc augauucagg aguggguacc acccaugcag 4380  
 gugcgcggcg gccgcgaugg caucgcgugg gccgucacua uauucugccc ggguguggug 4440  
 uuugacauua ccaauggcu uuuggcguug cuugggccug cuuaccucuu aagggccgcu 4500  
 uugacacaug ugccguacuu cgucagagcu cacgcucuga uaaggguaug cgcuuuggug 4560  
 aagcagcucg cggggggguag guauguucag guggcgcuau ugcccuugg cagguggacu 4620  
 ggcaccuaca ucuauagca ccucacaccu augucggacu gggccgcuag cggccugcgc 4680  
 gacuuagcgg ucgccgugga acccaucauc uucaguucca uggagaagaa ggucaucguc 4740  
 uggggagcgg agacggcugc auguggggac auucuacau gacuucccg guccgccga 4800  
 cucggccagg agauccuccu cggcccagcu gauggcuaca ccuccaaggg guggaagcuc 4860  
 cuugcuccca ucacugcuua ugcccagcaa acacgaggcc uccugggccc cauaguggug 4920  
 aguaugacgg ggcgugacag gacagaacag gccggggaag uccaaauccu guccacaguc 4980  
 ucucaguccu uccucggaac aaccaucucg gggguuuugu ggacuguua ccacggagcu 5040  
 ggcaacaaga cucuagccgg cuuacggggu ccgguacgc agauguacuc gagugcugag 5100  
 ggggacuugg uaggcuggcc cagccccccu gggaccaagu cuuuggagcc gugcaagu 5160  
 ggagccgucg accuauaucu ggucacgcgg aacgcugaug ucaucccggc ucggagacgc 5220  
 ggggacaagc ggggagcauu gcucuccccg agaccuauu cgaccuugaa gggguccucg 5280  
 gggggggccgg ugcucugccc uaggggccac gucguugggc ucuuccgagc agcuguguc 5340  
 ucucggggcg ugcccaaau caucgauuuc auccccguug agacacucga cguuguuaca 5400  
 agguucucca cuuucaguga caacagcacg ccaccggcug ugccccagac cuaucagguc 5460



ggguacuugc augcucaac uggcagugga aagagcacca aggucccugu cgcguaugcc 5520  
 gcccaggggu acaaaguacu agugcuuaac cccucggugag cugccacccu gggguuuggg 5580  
 gcguaccuau ccaaggcaca uggcaucaau cccaacauua ggacuggagu caggaccgug 5640  
 augaccgggg aggccaucac guacuccaca uauaggcaau uucucgccga ugggggcugc 5700  
 gcuagcggcg ccuaugacau caucauugc gaugaugcc acgcugugga ugcuaaccucc 5760  
 auucucggca ucggaaacggu ccuugaucaa gcagagacag ccgggggucag acuaacugug 5820  
 cuggcuacgg ccacaccccc cgggucagug acaaccccc aucccgauau agaagaggua 5880  
 ggccucgggc gggaggguga gaucccuuc uauaggaggg cgauucccu auccugcauc 5940  
 aaggaggga gacaccugau uuucugccac ucaaagaaa agugugacga gcucgcggcg 6000  
 gcccuucggg gcaugggcuu gaugccgug gcauacuaua gagggguugga cgucuccaua 6060  
 auaccagcuc agggagauu gguggucguc gccaccgacg ccucaugac gggguacacu 6120  
 ggagacuug acuccgugau cgacugcaau guagcgguca cccaagcugu cgacuucagc 6180  
 cuggaccca ccuucacuau aaccacacag acuguccac aagacgcugu cucacgcagu 6240  
 cagcgccgcg ggcgcacagg uagaggaaga cagggcacuu auagguaugu uuccacuggu 6300  
 gaacgagccu caggaauguu ugacagugua gugcuuugug agugcuacga cgcaggggcu 6360  
 gcgugguacg aucucacacc agcggagacc accgucaggc uuagagcgua uucaaacacg 6420  
 cccggccuac ccgugugua agaccaucuu gaauuuuggg aggcaguuuu caccggccuc 6480  
 acacacauag acgcccacuu ccucuccaa acaaagcaag cgggggagaa cuucgcguac 6540  
 cuaguagccu accaagcuac ggugugcgcc agagccaagg cccuccccc guccugggac 6600  
 gccaugugga agugccuggc ccgacuacg ccuacgcuug cggggccac accucuccug 6660  
 uaccguuugg gcccuauuac caaugagguc accucacac acccugggac gaaguacau 6720  
 gccacaugca ugcaagcuga ccuugagguc augaccagca cguggguccu agcuggagga 6780  
 guccuggcag ccgucgccgc auauugccug gcgacuggau gcguuuccau caucggccgc 6840  
 uugcacguca accagcgagu cgucguugcg ccggauaagg agguccugua ugaggcuuuu 6900  
 gaugagaugg aggaaugcg cucuaggcg gcucucaucg aagaggggca gcggauagcc 6960  
 gagauguuga aguccaagau ccaaggcuug cugcagcagg ccucuaagca ggcccaggac 7020  
 auacaacccg cuaugcaggc uucauggccc aaaguggaac aauuuugggc cagacacaug 7080  
 uggaacuua uuagcggcau ccauaccuc gcaggauugu caacacugcc agggaacccc 7140  
 gcgguggcuu ccaugauggc auucagugcc gccucacca guccguuguc gaccaguacc 7200  
 accauccuuc ucaacaucau gggaggcugg uuagcgucc agaucgcacc acccgcgggg 7260  
 gccaccggcu uuugcugcag uggccuggug ggggcugccg ugggcagcau aggccugggu 7320  
 aaggugcugg uggacauccu ggcaggauau ggugcgggca uuucgggggc ccucgucgca 7380  
 uucaagauga ugucuggcga gaagcccucu auggaagau ucaucaucu acugccuggg 7440  
 auccugucuc cgggagcccu gguggugggg gucaucugcg cggccauucu gcgccgccac 7500  
 gugggaccgg gggaggcgcc gguccaauug augaacaggc uuauugccu ugcuccaga 7560  
 ggaaaccacg ucgccccuac ucacuacgug acggagucgg augcgucgca gcgugugacc 7620  
 caacuacuug gcucucuua uauaaccagc cuacucagaa gacuccaaa uuggauacu 7680  
 gaggacugcc ccauccaug cuccggauc uggcuccgcg acguguggga cuggguuugc 7740  
 accaucuuga cagacucaa aaauuggcug accucuaau uguucccaa gcugcccggc 7800  
 cucccuuca ucucuugua aaagggguac aaggguugu gggccggcac uggcauacg 7860  
 accacgcgcu gccuugcgg cgccaacac ucuggcaaug uccgcuugg cucuaugagg 7920  
 aucacagggc cuaaaaccug caugaacacc uggcagggga ccuuccuau caauugcuac 7980  
 acggagggcc agucgcgcc gaaaccccc acgaacuaca agaccgccau cuggagggug 8040  
 gcggccucgg aguacgcgga ggugacgcag caugggucgu acuccuauu aacaggacug 8100  
 accacugaca aucugaaaau uccuugccaa cuaccuucuc cagaguuuuu cuccugggug 8160  
 gacggugugc agauccauag guuugcacc acaccaaagc cguuuuuccg ggaugagguc 8220  
 ucguucugcg uugggcuua uuccuauugc gucggguccc agcuuccug ugaaccugag 8280  
 cccgacgcag acguauugag guccaugcua acagaucgc cccacauac ggcggagacu 8340  
 gcggcgcggc gcuuggcacg gggauaccu ccaucugagg cgagcuccuc agugagccag 8400  
 cuaucagcac cgucgcugcg ggccaccugc accaccaca gcaacaccua ugacuggac 8460



```

auggucgaug ccaaccugcu cauggagggc gguguggcuc agacagagcc ugaguccagg 8520
gugcccguuc uggacuucuc cgagccaaug gccgaggaag agagcgaccu ugagcccua 8580
auaccaucgg agugcaugcu ccccaggagc ggguuuccac gggccuuacc ggcuugggca 8640
cggccugacu acaacccgcc gcucguggaa ucguggagga ggccagauua ccaaccgccc 8700
accguugcug guugugcucu ccccccccc aagaaggccc cgacgccucc cccaaggaga 8760
cgccggacag ugggucugag cgagagcacc auaucagaag ccuccagca acuggccauc 8820
aagaccuuug gccagcccc cucgagcggg gaugcagggc cguccacggg ggcgggcgcc 8880
gccgaauccg gcgguccgac gucccccuggu gagccggccc ccucagagac agguuccgcc 8940
uccucuaugc cccccucga gggggagccu ggagaucgg accuggaguc ugaucaggua 9000
gagcuucaac cccccccca gggggggggg guagcucccg guucgggcuc ggggucuugg 9060
ucuacuugcu ccgaggagga cgauaccacc gugugcugcu ccaugucau cuccuggacc 9120
ggggcucuaa uaacucccug uagccccgaa gaggaaaagu ugccaauca cccuuugagu 9180
aacucgcugu ugcgauacca uaacaaggug uacuguacaa caucaagag cgccucacag 9240
agggcuaaaa agguaacuuu ugacaggacg caagugcucg acgcccuaa ugacucaguc 9300
uuaaaggaca ucaagcuagc ggcuuccaag gucagcgcaa ggcuccucac cuuggaggag 9360
gcgugccagu ugacuccacc ccuucugca agauccaagu auggauucgg ggccaaggag 9420
guccgcagcu uguccgggag ggccguuaac cacaucaagu ccguguggaa ggaccuccug 9480
gaagaccac aaacaccau ucccacaacc aucauggcca aaaaugaggu guucugcgug 9540
gaccccgcca agggggguua gaaaccagcu cgccucaucg uuuaccuga ccucggcguc 9600
cgggucugcg agaaauggc ccucuaugac auuacacaaa agcuuccuca ggcgguaaug 9660
ggagcuuccu auggcuucca guacucccu gcccaacggg uggaguauc cuugaaagca 9720
ugggcggaaa agaaggacc cauggguuu ucguaugaua cccgaugcu cgacucaacc 9780
gucacugaga gagacaucag gaccgaggag uccauauacc aggccugcuc ccugcccag 9840
gaggcccgca cugccauaca cucgcugacu gagagacuuu acguaggagg gcccauguuc 9900
aacagcaagg gucaaaccug cgguuacaga cguugccgcg ccagcggggu gcuaaccacu 9960
agcaugggua acaccaucac augcuauug aaagcccuag cggccugcaa ggcugcgggg 10020
auaguugcgc ccacaaugcu gguaugcggc gaugaccuag uagucaucuc agaaagccag 10080
gggacugagg aggacgagcg gaaccugaga gccuucacgg aggccaugac cagguacucu 10140
gccccuccug gugaucccc cagaccggaa uaugaccugg agcuauaac auccuguucc 10200
ucaaaugugu cuguggcggu gggcccgcgg ggccgcccga gauacuaccu gaccagagac 10260
ccaaccacuc cacucgccc ggcugccugg gaaacaguua gacacucucc uaucaauuca 10320
uggcugggaa acaucaucca guaugcuca accauauggg uucgcauggu ccuaaugaca 10380
cacuucucu ccuucucuu gguccaagac acccuggacc agaaccuca cuuugagaug 10440
uauggaucau uauacuccg gaauccuuug gaccuuccag ccuaauuga gagguuacac 10500
gggcuugacg ccuuuucuu gcacacauac ucucaccacg aacugacgcg gguggcuuca 10560
gccucagaa aacuuggggc gccaccccuc agggugugga agagucgggc ucgcgcaguc 10620
agggcgucc ucaucucccg uggagggaaa gcggccguuu gcggccgaua ucucucaau 10680
ugggcgguga agaccaagcu caaacucacu ccuugccgg aggcgcgccu acuggacuua 10740
uccaguuggu ucaccgucgg cgccggcggg ggcgacauu uucacagcgu gucgcgccc 10800
cgaccccgcu cauuacucuu cgcccuacuc cuacuuuucg uagggguagg ccucuuccu 10860
cuccccgcuc gguagagcgg cacacacuag guacacucca uagcuaacug uuccuuuuu 10920
uuuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuccucuuu 10980
cuucccuucu caucuauuc uacuucuuu cuugguggc ccaucuagc ccuagucacg 11040
gcuagcugug aaagguccg gagccgcaug acugcagaga gugccguaac uggucucucu 11100
gcagaucaug u 11111

```

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 11111

&lt;212&gt; RNA

## &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: full-length Hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone, wherein an amino acid motif GDD has been mutated into GND

&lt;400&gt; 14

```

accugccccc aauaggggcg acacuccgcc augaaucacu cccugugag gaacuacugu 60
cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
ccccucccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aauugccggg 180
aagacugggu ccuuucuuug auaaaccac ucuaugcccg gccauuuggg cgugcccccg 240
caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauaggg 300
cgcuugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc augagcaca auccuaaacc 360
ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg ucgcccraag auugaacaag auggauugca 420
cgcagguucu ccggccgcuu ggguggagag gcuauucggc uaugacuggg cacaacagac 480
aaucggcugc ucugaugccg ccguguuccg gcugucagcg caggggcgcc cgguuuuuu 540
ugucaagacc gaccuguccg gugcccugaa ugaacugcag gacgaggcag cgcggcuau 600
guggcuggcc acgacgggcg uuccuugcgc agcugugcuc gacguuguca cugaagcggg 660
aagggacugg cugcuauugg gcgaagugcc ggggcaggau cuccugucau cucaccuugc 720
uccugccgag aaaguaacca ucauggcuga ugcaaugcgg cggcugcaua cguugaucc 780
ggcuaccugc ccauucgacc accaagcgaa acaucgcauc gagcgagcac guacucggau 840
ggaagccggg cuugucgauc aggaugaucu ggacgaagag caucaggggc ucgcgccagc 900
cgaacuguuc gccaggcuca aggcgcgcgau gcccgcggc gaggaucucg ucgugaccca 960
uggcgaugcc ugcuugccga auaucauggu ggaaaauagg cgcuuuucug gauucaucga 1020
cuguggccgg cugggugugg cggaccgcu ucaggacaua gcguuggcua cccgugauau 1080
ugcugaagag cuuggcggcg aaugggcuga ccgcuuccuc gugcuuuacg guaucgccgc 1140
ucccgauucg cagcgcaucg ccuucuaucg ccuucuuagc gaguucuuu gaguuuaaac 1200
ccucuccuc ccccccccu aacguuacug gccgaagccg cuuggaauaa ggccggugug 1260
cguuugucua uauguuuuu uccaccauau ugccgucuuu uggcaaugug agggcccggg 1320
aaccuggccc ugucuuucug acgagcauuc cuagggguc uuccccucuc gccaaaggaa 1380
ugcaaggucu guugaauguc gugaaggaag caguuccucu ggaagcuuc ugaagacaaa 1440
caacgucugu agcgacccu ugcaggcagc ggaaccccc accuggcgac aggugccucu 1500
gcggccaaaa gccacgugua uaagauacac cugcaaaggc ggcacaacc cagugccacg 1560
uugugaguug gauaguugug gaaagaguca aauggcucuc cucaagcgua uucaacaagg 1620
ggcugaagga ugcccagaag guaccccau guaugggauc ugaucugggg ccucggugca 1680
caugcuuuac auguguuuag ucgagguuaa aaaaacgucu agggcccccg aaccacgggg 1740
acgugguuuu ccuuugaaaa acacgaugau accaugagca caaauccua accucaaaga 1800
aaaacaaaa gaaacaccaa ccgucgccc gaagacguua aguucccggg cggcggccag 1860
aucguuggcg gaguauacuu guugccgcgc agggggcccc gguugggugu gcgcacgaca 1920
aggaaaacuu cggagcgguc ccagccacgu gggagacgcc agcccauucc caaagaucgg 1980
cgcuccacug gcaaggccug gggaaaacca ggucgccccu ggccccuaua ugggaaugag 2040
ggacucggcu gggcaggau gcuccugucc ccccgaggcu cucgcccuc cuggggcccc 2100
acugaccccc ggcauagguc gcgcaacgug gguaaaaguca ucgacaccu aacguuggc 2160
uuugccgacc ucauggggua caucccguc guaggcgccc cgcuuagugg cgccgccaga 2220
gcugucgcgc acggcgugag aguccuggag gacggggua auuaucaac agggaaaccua 2280
cccgguuucc ccuuuucua cuucuuugc gcccuguugu ccugcaucac cguuccgguc 2340
ucugcugccc aggugaagaa uaccaguagc agcuacaugg ugaccaauga cugcucaau 2400
gacagcauca cuuggcagcu cgaggcugcg guucuccacg uccccgggug cgucccguc 2460
gagagagugg ggaauacguc acgguguugg gugccagucu cgccaaacau ggcugugcgg 2520

```



cagcccggug cccucacgca gggucugcgg acgcacaucg auaugguugu gauguccgcc 2580  
 accuucugcu cugcucucua cgugggggac cucuguggcg gggugaugcu cgcggcccag 2640  
 guguucaucg ucucgccgca guaccacugg uuugugcaag aaugcaauug cuccaucuac 2700  
 ccuggcacca ucacuggaca ccgcauggca ugggacauga ugaugaacug gucgcccacg 2760  
 gccaccauga uccuggcgua cgugaugcgc guccccgagg ucaucauaga caucguuagc 2820  
 ggggcucacu ggggcgucan guucggcuug gccuacuucu cuaugcaggg agcgugggcg 2880  
 aaggucuuug ucauccuucu gcuggccgcg gggguggacg cgggcaccac caccguugga 2940  
 ggcgcuguug cacguuccac caacgugauu gccggcgugu ucagccaugg cccucagcag 3000  
 aacauucagc ucauuacac caacggcagu uggcacauca accguacugc cuugaauugc 3060  
 aaugacuccu ugaacaccgg cuuucucgcg gccuuguucu acaccaaccg cuuuacucg 3120  
 ucaggguugc cagggcgccu guccgccugc cgcaacaucg aggcuuuccg gauagggugg 3180  
 ggcacccuac aguacgagga uaaugucacc aaucagagg auaugaggcc guacugcugg 3240  
 cacuaccccc caaagccgug uggcguaguc cccgcgaggu cugugugugg cccaguguac 3300  
 uguuucaccc ccagcccggg aguagugggc acgaccgaca gacguggagu gccaccuac 3360  
 acauggggag agaauagagc agaugucuuc cuacugaaca gcacccgacc gccgcagggc 3420  
 ucaugguucg gcugcacgug gaugaacucc acugguuua ccaagacuug uggcgcgcca 3480  
 ccuugccgca ccagagcuga cuucaacgcc agcacggacu uguugugccc uacggauugu 3540  
 uuaggaagc auccugaugc cacuuauuu aagugugguu cugggcccug gcucacacca 3600  
 aagugccugg uccacuaccc uuacagacuc uggaauuacc ccugcacagu cauuuuuacc 3660  
 aucuucaaga uaagaaugua uguagggggg guugagcaca ggcucacggc cgcaugcaac 3720  
 uucacucgug gggauccgug cgacuuggag gacagggaca ggagucagcu gucuccucug 3780  
 uugcacucua ccacggaaug ggccauccug cccugcaccu acucagacuu acccgcuug 3840  
 ucaacugguc uucuccaccu ucaccagaac aucguggacg uacaauacau guauggccuc 3900  
 ucaccugcua ucacaaaaua cgucguucga uggauguggg uguuacucu auuccugcuc 3960  
 uuagcggacg ccagagucug cgccugcuug uggaugcuca ucuuguuggg ccaggccgaa 4020  
 gcagcauugg agaaguuggu cgucuuugc gcugcgagug cggcuacug ccauggccuc 4080  
 cuauauuuug ccaucuuucu cguggcagcu uggaacauca ggggucgggu ggucuccuug 4140  
 accaccuauu gccucacugg ccuauggccc uucugccuac ugcucauggc acugccccgg 4200  
 caggcuuauu ccuauagcgc accugugcac ggacagauag gcguggguuu guugauauug 4260  
 aucaccucu ucacacucac cccggggguu aagaccucc ucggccagug ucuguggugg 4320  
 uuugucuauc uccugacccu gggggaagcc augauucagg aguggguacc acccaugcag 4380  
 gugcgcggcg gccgcgaugg caucgcgugg gccgucacua uauucugccc ggguguggug 4440  
 uuugacauua ccaauuggcu uuuggcguug cuugggcccug cuuaccucu aagggccgcu 4500  
 uugacacaug ugccguacu cgucagagcu cacgcucuga uaaggguuug cgcuuuggug 4560  
 aagcagcucg cggggggguag guauguucag guggcgcuau ugcccuugg cagguggacu 4620  
 ggcaccuaca ucuauagca ccucacaccu augucggacu gggccgcuag cggccugcgc 4680  
 gacuuagcgg ucgccgugga acccaucauc uucaguccga uggagaagaa ggucaucguc 4740  
 uggggagcgg agacggcugc auguggggac auucuaucg gacuucccgu guccgccga 4800  
 cucggccagg agauccuccu cggcccagcu gauggcuaca ccuccaaggg guggaagcuc 4860  
 cuugcucca ucacugcuua ugcccagcaa acacgaggcc uccugggcgc cauaguggug 4920  
 augaugacgg ggcgugacag gacagaacag gccggggaag uccaaauccu guccacaguc 4980  
 ucucaguccu uccucggaac aaccaucuc gggguuuugu ggacuguua ccacggagcu 5040  
 ggcaacaaga cucuagccgg cuuacggggu ccggucacgc agauguacuc gagugcugag 5100  
 ggggacuugg uaggcuggcc cagccccccu gggaccaagu cuuuggagcc gugcaagugu 5160  
 ggagccgucg accuauaucu ggucacgcgg aacgcugaug ucaucccggc ucggagacgc 5220  
 ggggacaagc ggggagcauu gcucuccccg agaccuauu cgaccuugaa gggguccucg 5280  
 gggggggccgg ugcucugccc uaggggccac gucguugggc ucuuccgagc agcugugugc 5340  
 ucucggggcg ugccaaauc caucgauuuc auccccguug agacacucga cguuguuaca 5400  
 agguucucca cuuucaguga caacagcacg ccaccggcug ugccccagac cuaucagguc 5460  
 ggguaucugc augcuccaac uggaugugga aagagcacca aggucccugu cgcguaugcc 5520



gcccaggggu acaaaguacu agugcuuaac cccucgguag cugccacccu gggguuuggg 5580  
 gcguaccuau ccaaggcaca uggcaucaau cccaacauua ggacuggagu caggaccgug 5640  
 augaccgggg aggccaucac guacuccaca uauaggcaau uucucgccga ugggggcugc 5700  
 gcuagcggcg ccuaugacau caucauauugc gaugaauugc acgcugugga ugcuaaccucc 5760  
 auucucggca ucggaacggu ccuugaucaa gcagagacag ccggggucag acuaacugug 5820  
 cuggcuacgg ccacaccccc cgggucagug acaaccccc aucccgauau agaagaggua 5880  
 ggccucgggc gggaggguga gaucccccuc uaugggaggg cgauuccccu auccugcauc 5940  
 aaggagggga gacaccugau uuucugccac ucaaagaaaa agugugacga gcucgcggcg 6000  
 gcccuucggg gcaugggcuu gaauugccgug gcauacuaua gagguugga cgucuccaua 6060  
 auaccagcuc agggagaugu gguggucguc gccaccgacg ccucaugac gggguacacu 6120  
 ggagacuuug acuccgugau cgacugcaau guagcgguca cccaagcugu cgacuucagc 6180  
 cuggacccca ccuucacuau aaccacacag acuguccac aagacgcugu cucacgcagu 6240  
 cagcgcccg ggcgcacagg uagaggaaga cagggcacuu auagguaugu uuccacuggu 6300  
 gaacgagccu caggaauuu ugacagugua gugcuuugug agugcuacga cgcaggggcu 6360  
 gcgugguacg aucucacacc agcggagacc accgucaggc uuagagcgua uucaaacacg 6420  
 cccggccuac ccgugugua agaccaucuu gaauuuuggg aggcaguuuu caccggccuc 6480  
 acacacauag acgcccacuu ccucucccaa acaaagcaag cgggggagaa cuucgcguac 6540  
 cuaguagccu accaagcuac ggugugcgcc agagccaagg cccuccccc guccugggac 6600  
 gccaugugga agugccuggc ccgacucaag ccuacgcuug cgggccccac accucuccug 6660  
 uaccguuugg gcccuauuac caaugagguc acccucacac acccugggac gaaguacauc 6720  
 gccacaugca ugcaagcuga ccuugagguc augaccagca cguggguccu agcuggagga 6780  
 guccuggcag ccgucgccgc auauugccug gcgacuggau gcguuuccau caucggccgc 6840  
 uugcacguca accagcgagu cgucguugcg ccggauaagg agguccugua ugaggcuuuu 6900  
 gaugagaugg aggaauugcg cucuagggcg gcucucaucg aagaggggca gcggauagcc 6960  
 gagauguuga aguccaagau ccaaggcuug cugcagcagg ccucuaagca ggcccaggac 7020  
 auacaacccg cuaugcaggc uucauggccc aaaguggaac aauuuugggc cagacacaug 7080  
 uggaacuua uuagcggcau ccaauaccuc gcaggauugu caacacugcc agggaacccc 7140  
 gcgguggcuu ccaugauggc auucagugcc gccucacca guccguuguc gaccaguacc 7200  
 accauccuuc ucaacaucau gggagggcug uuagcgucc agaucgcacc acccgcgggg 7260  
 gccaccggcu uugucgucag uggccuggug ggggcugccg ugggcagcau aggccugggu 7320  
 aaggugcugg uggacaucuu ggcaggauau ggugcgggca uuucgggggc ccucgucgca 7380  
 uucaagauga ugucuggcga gaagcccucu auggaagaug ucaucauuc acugccuggg 7440  
 auccugucuc cgggagcccu gguggugggg gucaucugcg cggccauucu gcgccgccac 7500  
 gugggaccgg gggagggcg gcuccaugg augaacaggc uuauugccu ugcuaaccaga 7560  
 ggaaaccacg ucgccccuac ucacuacgug acggagucgg augcgucgca gcgugugacc 7620  
 caacuacuug gcucucuua uauaaccagc cuacucagaa gacuccacaa uuggauaacu 7680  
 gaggacugcc ccaucccaug cuccggauc uggcucccg acguguggga cuggguuugc 7740  
 accaucuuga cagacuucua aaauuggcug accucuaau uguucccaa gcugcccggc 7800  
 cuccccuua ucucuugua aaagggguac aaggguugu gggccggcac uggcaucaug 7860  
 accacgcgu gcccuugcg cgccaacau ucuggcaug uccgccuggg cucuaugagg 7920  
 aucacagggc cuaaaaccug caugaacacc uggcagggga ccuuuccuau caauugcuac 7980  
 acggagggcc agugcgcgcc gaaaccccc acgaacuaca agaccgccau cuggagggug 8040  
 gcggccucgg aguacgcgga ggugacgcag caugggucgu acuccuauu aacaggacug 8100  
 accacugaca aucugaaaau uccuugccaa cuaccuucuc cagaguuuuu cuccugggug 8160  
 gacggugugc agauccauag guuugcacc acaccaaagc cguuuuuccg ggaugagguc 8220  
 ucguucugcg uugggcuua uuuccuauug gucggguccc agcuucccug ugaaccugag 8280  
 cccgacgcag acguauugag guccaugcua acagaucgc cccacauac ggcggagacu 8340  
 gcggcgcggc gcuuggcacg gggauaccu ccaucugagg cgagcuccuc agugagccag 8400  
 cuaucagcac cgucgcugcg ggccaccugc accaccaca gcaacaccua ugacugggac 8460  
 auggucgaug ccaaccugcu cauggagggc gguguggcuc agacagagcc ugaguccagg 8520

gugcccguuc uggacuuucu cgagccaaug gccgaggaag agagcgaccu ugagcccuca 8580  
auaccaucgg agugcaugcu ccccaggagc ggguuuccac gggccuuacc ggcuugggca 8640  
cggccugacu acaacccgcc gcucguggaa ucguggagga ggccagauua ccaaccgccc 8700  
accguugcug guugugcucu ccccccccc aagaaggccc cgacgccucc cccaaggaga 8760  
cgccggacag ugggucugag cgagagcacc auaucagaag ccuccagca acuggccauc 8820  
aagaccuuug gccagccccc cucgagcggg gaugcaggcu cguccacggg ggcgggcgcc 8880  
gccgaauccg gcgguccgac gucccccuggu gagccggccc ccucagagac agguuccgcc 8940  
uccucuaugc cccccucga gggggagccu ggagauccgg accuggaguc ugaucaggua 9000  
gagcuucaac cucccccca gggggggggg guagcucccg guucgggcuc ggggucuugg 9060  
ucuacuugcu ccgaggagga cgauaccacc gugugcugcu ccaugucaua cuccuggacc 9120  
ggggcucuaa uaacucccug uagccccgaa gaggaaaagu ugccaauca cccuuugagu 9180  
aacucgcugu ugcgauacca uaacaaggug uacuguacaa caucaaaagag cgccucacag 9240  
agggcuaaaa agguaacuuu ugacaggacg caagugcucg acgcccuaa ugacucaguc 9300  
uuaaaggaca ucaagcuagc ggcuuccaag gucagcgcaa ggcuccucac cuuggaggag 9360  
gcgugccagu ugacuccacc ccuucugca agauccaagu auggauucgg ggccaaggag 9420  
guccgcagcu uguccgggag ggccguuaac cacaucagu ccguguggaa ggaccuccug 9480  
gaagaccac aaacaccau ucccacaacc aucauggcca aaaaugaggu guucugcgug 9540  
gaccccgcca agggggguua gaaaccagcu cgccucaucg uuuaccuga ccucggcguc 9600  
cgggucugcg agaaauggc ccucuaugac auuacacaaa agcuuccuca ggcgguaaug 9660  
ggagcuuccu auggcuucca guacucccu gcccaacggg uggaguauu cuugaaagca 9720  
ugggcggaaa agaaggacc cauggguuu ucguaugaua cccgaugcu cgacucaacc 9780  
gucacugaga gagacaucag gaccgaggag uccauauacc aggccugcuc ccugcccgag 9840  
gaggcccgca cugccauaca cucgcugacu gagagacuu acguaggagg gcccauguuc 9900  
aacagcaagg gucaaaccug cgguuacaga cguugccgcg ccagcggggu gcuaaccacu 9960  
agcaugggua acaccaucac augcuauug aaagcccuag cggccugcaa ggcugcgggg 10020  
auaguugcgc ccacaauugc gguaugcggc aaugaccuag uagucaucuc agaaagccag 10080  
gggacugagg aggacgagcg gaaccugaga gccuucacgg agccaugac cagguacucu 10140  
gccccuccug gugauccccc cagaccggaa uaugaccug agcuauaac auccuguucc 10200  
ucaaaugugu cuguggcguu gggcccgcgg ggccgcccga gauacuaccu gaccagagac 10260  
ccaaccacuc cacucgcccg ggcugccugg gaaacaguua gacacucucc uaucaauuca 10320  
uggcugggaa acaucaucca guaugcuca accauauggg uucgcauggu ccuaaugaca 10380  
cacuucuucu ccuucucuu gguccaagac acccuggacc agaaccuca cuuugagaug 10440  
uauggauagc uauacuccgu gaauccuuug gaccuuccag ccuaauuga gagguuacac 10500  
gggcuugacg ccuuuucuu gcacacauac ucucaccacg aacugacgcg gguggcuuca 10560  
gccucagaa aacuuggggc gccaccccuc agggugugga agagucgggc ucgcgcaguc 10620  
agggcgucc ucaucucccg uggagggaaa gcggccguuu gcggccgaua ucucuucuu 10680  
ugggcgguga agaccaagcu caaacucacu ccuugccgg aggcgcgccu acuggacuua 10740  
uccaguuggu ucaccgucgg cgccggcggg ggcgacuuu uucacagcgu gucgcgcgcc 10800  
cgaccccgcu cauucucuu cggccuacuc cuacuuuucg uaggguagg ccucuuccua 10860  
cuccccgcuc gguagagcgg cacacacuag guacacucca uagcuaacug uuccuuuuu 10920  
uuuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuccucuuu 10980  
cuucccuucu caucuauuc uacuucuuu cuuggugcu ccaucuagc ccuagucag 11040  
gcuagcugug aaagguccgu gagccgcaug acugcagaga gugccguaac uggucucucu 11100  
gcagaucaug u 11111

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 9707

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence



&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: replicon RNA comprising full-length Hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone, wherein an amino acid motif GDD has been mutated into GND

&lt;400&gt; 15

```

gaauucuaau acgacucacu auagaccugc ccuaauagg ggcgacacuc cgccaugaau 60
cacuccccug ugaggaacua cugucuucac gcagaaagcg ccuagccaug gcguuaguau 120
gagugucgua cagccuccag gcccccccu cccgggagag ccuaguggu cugcggaacc 180
ggugaguaca ccggaauugc cgggaagacu ggguccuuuc uuggauaaac ccacucuaug 240
cccggccaau ugggcgugcc cccgcaagac ugcuaagccga guagcguugg guugcgaaag 300
gccuuguggu acugccugau agggcgcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug 360
caccaugagc acaauuccua aaccucaaag aaaaaccaa agaaacacca accgucgccc 420
agaagacguu aaguucccg ggcggcgcca gaucguuggc ggaguauacu uguugccgcg 480
caggggcccc agguugggug ugcgcacgac aaggaaaacu ucggagcggg cccagccacg 540
ugggagacgc cagcccaucc ccaaagaucg gcgcuccacu ggcaaggccu ggggaaaacc 600
aggucgcccc uggccccuau augggauga gggacucggc ugggcaggau ggcuccuguc 660
cccccgaggc ucucgccccu ccuggggccc cacugacccc cggcauaggu cgcgcaacgu 720
ggguaaaaguc aucgacaccc uaacgugugg cuuugccgac cucauggggg acauccccgu 780
cguaggcgcc ccgcuuagug gcgcccgcag agcugucgcg cacggcguga gaguccugga 840
ggacgggggu aauuauugcaa cagggaaccu acccgguuuc cccuuuucua ucuucucgu 900
ggcccugug uccugcauca ccguuccggu cucugcugcc caggugaaga auaccaguag 960
cagcuacaug gugaccaaug acugcuccaa ugacagcauc acuuggcagc ucgaggcugc 1020
gguucuccac guccccgggu gcgucggcug cgagagagug gggauuacgu cacgguguug 1080
ggugccaguc ucgccaaca uggcugugcg gcagcccggg gccucacgc agggucugcg 1140
gacgcacauc gauaugguug ugauguccgc caccuucugc ucugcucucu acguggggga 1200
ccucuguggc ggggugaugc ucgcggccca gguguuacuc gucucgcccg aguaccacug 1260
guuugugcaa gaugcaauu gcuccaucua ccuuggcacc aucacuggac accgcauggc 1320
augggacaug augaugaacu ggucggccac ggccaccaug auccuggcgu acgugaugcg 1380
cgucggcgag gucaucauag acaucguuag cggggcucac uggggcgua uguucggcuu 1440
ggccuacuuc ucuauagcagg gagcgugggc gaaggucuu gucauccuuc ugcuggccgc 1500
ugggguggac gcgggcacca ccaccguugg aggcgcuguu gcacguucca ccaacgugau 1560
ugccggcgug uucagccaug gcccucagca gaacauucag cucauuuaca ccaacggcag 1620
uuggcacauc aaccguacug ccuugaauug caaugacucc uugaacaccg gcuuucucgc 1680
ggccuuguuc uacaccaacc gcuuuaacuc gucaggguu ccaggcgcc uguccgccug 1740
ccgcaacauc gaggcuuucc ggauagggug gggcacccua caguacgagg auaaugucac 1800
caauccagag gauaugaggc cguacugcug gcacuacccc ccaaagccgu guggcguagu 1860
ccccgcgagg ucugugugug gcccagugua cuguuucacc cccagcccgg uaguaguggg 1920
cacgaccgac agacguggag ugcccaccua ccaugggga gagaugaga cagaugucu 1980
ccuacugaac agcaccgcg cgcgcaggg cucaugguuc ggcugcacgu ggaugaacuc 2040
cacugguuuc accaagacu guggcgcgcc accuugccgc accagagcug acuucaacgc 2100
cagcacggac uuguugugcc cuacggauug uuuuaggaag cauccugaug ccacuauau 2160
uaaguguggu ucugggccc ggcucacacc aaagugccug guccacuacc cuuacagacu 2220
cuggcauuac ccugcacag ucauuuuuac caucucaag auaagaugu auguaggggg 2280
gguugagcac aggcucacgg ccgcaugcaa cuucacucgu ggggaucgcu gcgacuugga 2340
ggacagggac aggagucagc ugucuccucu guugcacucu accacggau gggccauc 2400
gccucgacc uacucagacu uaccgcguu gucaacuggu cuucuccacc uucaccagaa 2460
caucguggac guacaauaca uguauggccu cucaccugcu aucacaaaau acgucguucg 2520
augggagugg gugguacucu uauuccugcu cuuagcggac gccagagucu gcgcugcuu 2580

```



guggaugcuc aucuuguugg gccaggccga agcagcauug gagaaguugg ucgucuugca 2640  
 cgcugcgagu gcggcuaacu gccauggccu ccuaauuuuu gccaucuucu ucguggcagc 2700  
 uuggcacau caggguucggg uggucccccuu gaccaccuau ugccucacug gccuauggcc 2760  
 cuucugccua cugcucaugg cacugccccg gcaggcuuau gccuaugacg caccugugca 2820  
 cggacagaua ggcguggguu uguugauuuu gaucaccuc uucacacuca ccccggggua 2880  
 uaagaccuc cucggccagu gucuguggug guugugcuau cuccugacc ucgggggaagc 2940  
 caugauucag gaguggguac cacccaugca ggugcgcggc ggccgcgaug gcaucgcgug 3000  
 ggccgucacu auauucugcc cggguguggu guuugacauu accaaauggc uuuuggcguu 3060  
 gcuugggccu gcuuaccucu uaagggccgc uuugacacau gugccguacu ucgucagagc 3120  
 ucacgcucug auaaggguau gcgcuuuggu gaagcagcuc gcggggggua gguauguua 3180  
 gguggcgcua uuggcccuug gcagguggac uggcaccuac aucuaugacc accucacacc 3240  
 uaugucggac ugggccgcua gcggccugcg cgacuuagcg gucgccgugg aaccacau 3300  
 cuucaguccg auggagaaga aggucaucgu cuggggagcg gagacggcug caugugggga 3360  
 cauucuaau ggacuucccg uguccgccc acucggccag gagauccucc ucggcccagc 3420  
 ugauggcuac accuccaagg gguggaagcu ccuugcucc aucacugcuu augcccagca 3480  
 aacacgaggc cuccugggcg ccuauguggu gaguaugacg gggcgugaca ggacagaaca 3540  
 ggccggggaa guccaaaucc uguccacagu cucucagucc uuccucggaa caaccaucuc 3600  
 ggggguuuug uggacuguuu accacggagc uggcaacaag acucuagccg gcuuacgggg 3660  
 uccggucacg cagauguacu cgagugcuga gggggacuug guaggcuggc ccagcccccc 3720  
 ugggaccaag ucuuuggagc cgugcaagug uggagccguc gaccuauauc uggucacgcg 3780  
 gaacgcugau gucaucccg cucggagacg cggggacaag cggggagcau ugcucucccc 3840  
 gagaccuau ucgaccuuga agggguccuc gggggggccg gugcucugcc cuaggggcca 3900  
 cgucguuggg cucuuccgag cagcugugug cucucggggc guggccaaau ccaucgauu 3960  
 caucccggu gagacacuc acguuguuac aaggucucc acuuucagug acaacagcac 4020  
 gccaccggcu gugccccaga ccuaucaggu cggguacuug caugcuccaa cuggcagugg 4080  
 aaagagcacc aagguccug ucgcguaugc cgcccagggg uacaaaguac uagugcuuaa 4140  
 cccucggua gcugccacc ucggguuugg ggcguaccua uccaaggcac auggcauca 4200  
 ucccaacau aggacuggag ucaggaccgu gaugaccggg gaggccauca cguacuccac 4260  
 auauaggcaa uuucucgcc augggggcug cgcuagcggc gccuaugaca ucaucauug 4320  
 cgaugaugc cacgcugugg augcuaccuc cauucucggc aucggaacgg uccuugauca 4380  
 agcagagaca gccggggua gacuaacugu gcuggcuacg gccacacccc ccgggucagu 4440  
 gacaaccccc cauuccgaua uagaagaggu aggccucggg cgggaggggug agauccccu 4500  
 cuauaggagg gcgauuccc uauccugcau caaggaggag agacaccuga uuuucugcca 4560  
 cucaaagaaa aagugugacg agcucgcggc ggcccuucgg ggcaugggcu ugaauccgu 4620  
 ggcauacuau agaggguugg acgucuccau aaauaccagcu cagggagaug ugguggucgu 4680  
 cgccaccgac gccucauga cggggguacac uggagacuuu gacuccguga ucgacugcaa 4740  
 uguagcgguc acccaagcug ucgacuucag ccuggacccc accuucacua uaaccacaca 4800  
 gacuguccca caagacgcug ucucacgcag ucagcgccgc gggcgcacag guagaggaag 4860  
 acagggcacu uauagguaug uuuccacugg ugaacgagcc ucaggaaugu uugacagugu 4920  
 agugcuuugu gagugcuacg acgcaggggc ugcgugguac gaucucacac cagcggagac 4980  
 caccgucagg cuuagagcgu auuucacac gcccgccua cccguguguc aagaccauc 5040  
 ugaauuuugg gaggcaguuu ucaccggccu cacacacua gacgccacu uccucucca 5100  
 aacaaagcaa gcgggggaga acuucgcgua ccuaguagcc uaccaagcu cggugugcg 5160  
 cagagccaag gcccucccc cguccuggga cgccaugugg aagugccugg cccgacuca 5220  
 gccuacgcu gcgggcccc caccucuccu guaccguuug ggcccuaua ccaaugaggu 5280  
 caccucaca caccuggga cgaaguacau cgccacaugc augcaagcug accuugaggu 5340  
 caugaccagc acgugggucc uagcuggagg aguccuggca gccgucgccg cauauugcu 5400  
 ggcgacugga ugcguuucca ucaucggccg cuugcacguc aaccagcgag ucgucguugc 5460  
 gccggauaag gagguccugu augaggcuu ugaugagaug gaggaugcg ccucuagggc 5520  
 ggcucucauc gaagaggggc agcggaugc cgagauguug aaguccaaga uccaaggcu 5580

gcugcagcag	gccucuaagc	aggcccagga	cauacaaccc	gcuaugcagg	cuucauggcc	5640
caaaguggaa	caauuuuggg	ccagacacau	guggaacuuc	auuagcggca	uccaauaccu	5700
cgcaggauug	ucaacacugc	cagggaaccc	cgcgguggcu	uccaugaugg	cauucagugc	5760
cgcuccuacc	aguccguugu	cgaccaguac	caccauccuu	cucaacauc	ugggagggcug	5820
guuagcgucc	cagaucgcac	cacccgcggg	ggccaccggc	uuugucguca	guggccuggu	5880
gggggcugcc	gugggcagca	uaggccuggg	uaaggugcug	guggacaucc	uggcaggaua	5940
uggugcgggc	auuucggggg	cccucgucgc	auucaagauc	augucuggcg	agaagcccuc	6000
uauuggaagau	gucaucaauc	uacugccugg	gauccugucu	ccgggagccc	uggugguggg	6060
ggucaucugc	gcggccauuc	ugcgccgcca	cgugggaccg	ggggagggcg	cgguccaauug	6120
gaugaacagg	cuuauugccu	uugcuuccag	aggaaaccac	gucgccccua	cucacuacgu	6180
gacggagugc	gaugcgucgc	agcgugugac	ccaacuacuu	ggcucucuu	cuauaaccag	6240
ccuacucaga	agacuccaca	auuggauaac	ugaggacugc	cccaucccau	gcuccggau	6300
cuggcuccgc	gacguguggg	acuggguuug	caccaucuu	acagacuua	aaaauuggcu	6360
gaccucuaaa	uuguucccca	agcugcccgg	ccuccccuuc	aucucuuguc	aaaaggggua	6420
caaggguugug	ugggcccggca	cuggcaucau	gaccacgcgc	ugcccuugcg	gcgccaacau	6480
cucuggcaau	guccgccugg	gcucuaugag	gaucacaggg	ccuaaaaccu	gcaugaacac	6540
cuggcagggg	accuuuccua	ucaauugcua	cacggagggc	cagugcgcg	cgaaccccc	6600
cacgaacuac	aagaccgcca	ucuggagggu	ggcggccucg	gaguacgcgg	aggugacgca	6660
gcauggguugc	uacuccuau	uaacaggacu	gaccacugac	aaucugaaaa	uuccuugcca	6720
acuaccuucu	ccagaguuuu	ucuccugggu	ggacggugug	cagauccaau	gguuugcacc	6780
cacaccaaag	ccguuuuucc	gggaugaggu	cucguucugc	guugggcuua	auuccuau	6840
ugucgggucc	cagcuucccu	gugaaccuga	gcccgcgcga	gacguauuga	gguccaugcu	6900
aacagaucgg	ccccacauca	cggcggagac	ugcggcgcg	cgcuuaggac	ggggaucacc	6960
uccaucugag	gcgagcuccu	cagugagcca	gcuaucagca	ccgucgcugc	gggccaccug	7020
caccaccac	agcaaacaccu	augacgugga	cauggucgau	gccaaccugc	ucauggaggg	7080
cgguguggcu	cagacagagc	cugaguccag	ggugcccguu	cuggacuuc	ucgagccaau	7140
ggccgaggaa	gagagcgacc	uugagcccuc	aaauaccaucg	gagugcaugc	uccccaggag	7200
cggguuucca	cgggccuuac	cggcuugggc	acggccugac	uacaacccgc	cgcucgugga	7260
aucguggagg	aggccagauu	accaaccgcc	caccguugcu	gguuugucuc	ccccccccc	7320
caagaaggcc	ccgacgccuc	ccccaggag	acgccggaca	gugggucuga	gcgagagcac	7380
cauaucagaa	gccuccagc	aacuggccau	caagaccuuu	ggccagcccc	ccucgagcgg	7440
ugaugcaggc	ucguccacgg	gggcgggcgc	cgccgaaucc	ggcgguccga	cguccccugg	7500
ugagccggcc	cccucagaga	cagguuccgc	cuccucuaug	ccccccucg	aggggggagcc	7560
uggagaucgg	gaccuggagu	cugaucaggu	agagcuucaa	ccucccccc	agggggggggg	7620
gguagcuccc	gguuucgggc	cggggucuu	gucuacuugc	uccgaggagg	acgauaccac	7680
cguugucugc	uccaugucau	acuccuggac	cgggggcucua	auaacucccu	guagccccga	7740
agaggaaaag	uugccaauca	accuuugag	uaacucgcug	uugcgauacc	auaacaaggu	7800
guacuguaca	acaucaaa	gcgccucaca	gagggcuaaa	aagguaacuu	uugacaggac	7860
gcaagugcuc	gacgcccacu	augacucagu	cuuaaaggac	aucaagcuag	cggcuuccaa	7920
ggucagcgca	aggcuccuca	ccuuggagga	ggcgugccag	uugacuccac	cccuuucugc	7980
aagauccaag	uauuggauucg	gggccaaggga	gguccgcagc	uuguccggga	gggccguuaa	8040
ccacaucaag	uccgugugga	aggaccuccu	ggaagacca	caaacacca	uucccacaac	8100
caucauggcc	aaaaaugagg	uguucugcgu	ggaccccgcc	aaggggggua	agaaaccagc	8160
ucgccucauc	guuuaccucg	accucggcgu	ccgggucugc	gagaaaauug	cccucuauga	8220
cauuacacaa	aagcuuccuc	aggcgguau	gggagcuucc	uauggcuucc	aguacucccc	8280
ugcccaacgg	guggaguau	ucuugaaagc	augggcggaa	aagaaggacc	ccauggguuu	8340
uucguaugau	acccgaugcu	ucgacucaac	cguacugag	agagacauca	ggaccgagga	8400
guccauauac	caggccugcu	cccugcccga	ggaggcccgc	acugccauac	acucgcugac	8460
ugagagacuu	uacguaggag	ggcccauguu	caacagcaag	ggucaaaccu	gcgguuacag	8520
acguugccgc	gccagcgggg	ugcuuaccac	uagcaugggu	aacaccauca	caugcuau	8580



gaaagcccua gcggccugca aggcugcggg gauaguugcg cccacaaugc ugguaugcgg 8640  
 caaugaccua guagucaucu cagaaagcca ggggacugag gaggacgagc ggaaccugag 8700  
 agccuucacg gaggccauga ccagguacuc ugccccuccu ggugaucucc ccagaccgga 8760  
 auaugaccug gagcuaauaa cauccuguuc cucaaauug ucuguggcgu ugaggcccg 8820  
 gggccgccc agauacuacc ugaccagaga cccaaccacu ccacucgccc gggcugccug 8880  
 ggaaacaguu agacacuccc cuaucaauuc auggcuggga aacaucaucc aguaugcucc 8940  
 aaccauaugg guucgcaugg uccuaaugac acacuucuu uccauucuca ugguccaaga 9000  
 caccugggac cagaaccuca acuuugagau guauggauga guauacuccg ugaauccuuu 9060  
 ggaccuucca gccauaaauug agagguuaca cgggcuugac gccuuuucua ugcacacua 9120  
 cucucaccac gaacugacgc ggguggcuuc agcccucaga aaacuugggg cgccaccccu 9180  
 cagggugugg aagagucggg cucgcgcagu cagggcgucc cucaucuccc guggagggaa 9240  
 agcggccguu ugcggccgau aucucucaa uugggcggug aagaccaagc ucaaacucac 9300  
 uccauugccg gaggcgcgcc uacuggacuu auccaguugg uucaccgucg gcgccggcgg 9360  
 gggcgacauu uuucacagcg ugucgcgcgc ccgaccccg ucauuacucu ucggccuacu 9420  
 ccuacuuuuc guagggguag gccucuuccu acuccccgcu cgguagagcg gcacacacua 9480  
 gguacacucc auagcuaacu guuccuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu 9540  
 uuuuuuuucu uuuuuuuuu uuucccucu ucuucccuuc ucaucuuau cuacuuucu 9600  
 ucuugguggc uccaucuuag ccuagucac ggcuagcugu gaaagguccg ugagccgcau 9660  
 gacugcagag agugccguaa cuggucucuc ugcagauc au gucuaga 9707

<210> 16  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 16  
 cgaggagagcc atagtgg 17

<210> 17  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 17  
 agtaccacaa ggcctttcg 19

<210> 18  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence



<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 18  
ctgcggaacc ggtgagtaca c 21

<210> 19  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:primer

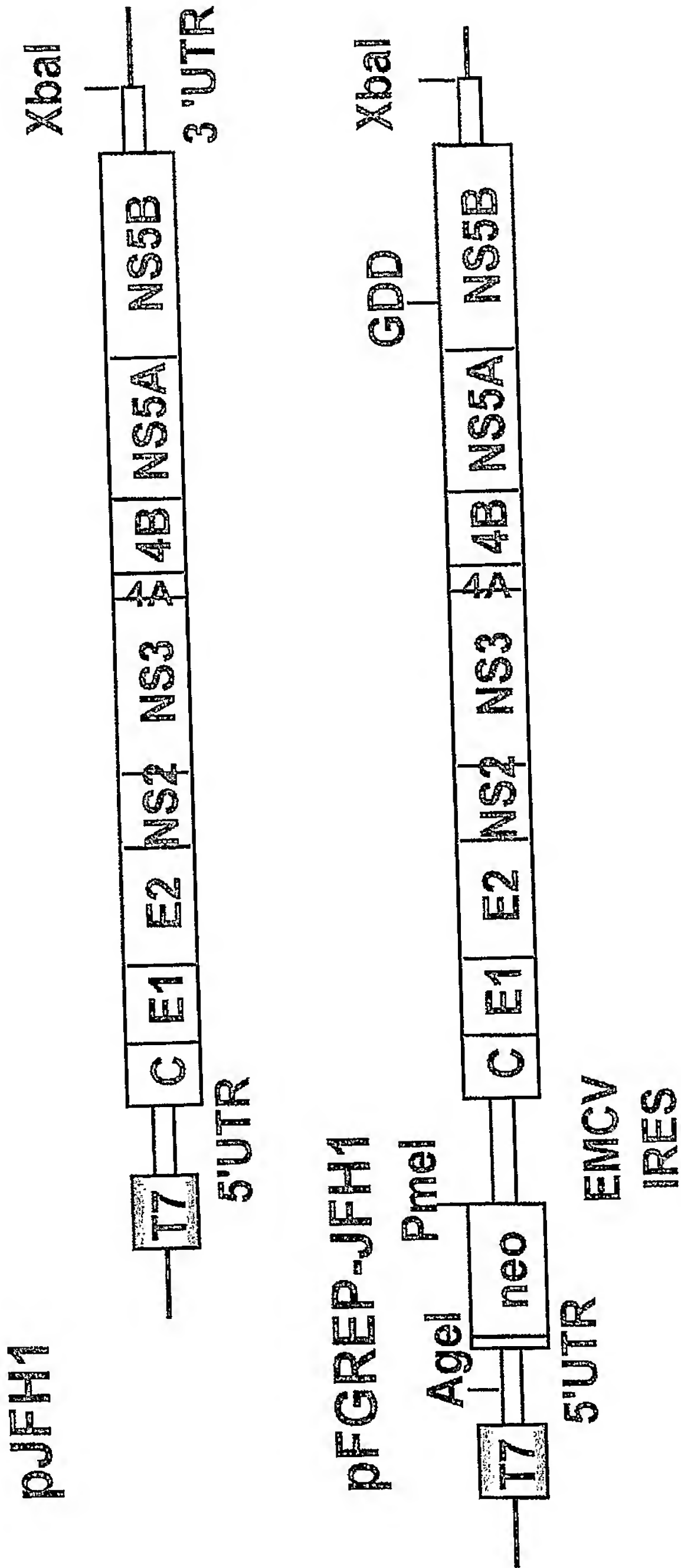
<400> 19  
aacaagatgg attgcacgca 20

<210> 20  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

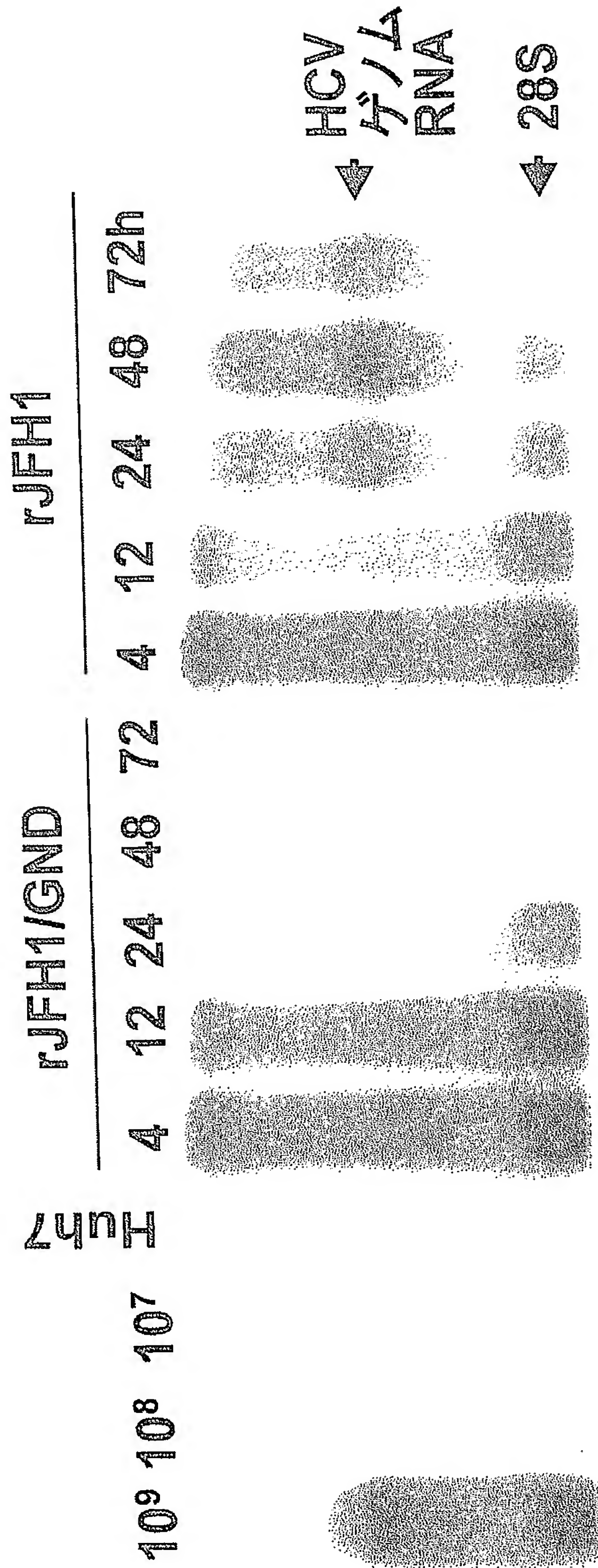
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 20  
cgtcaagaag gcgatagaag 20

【書類名】 図面  
【図 1】

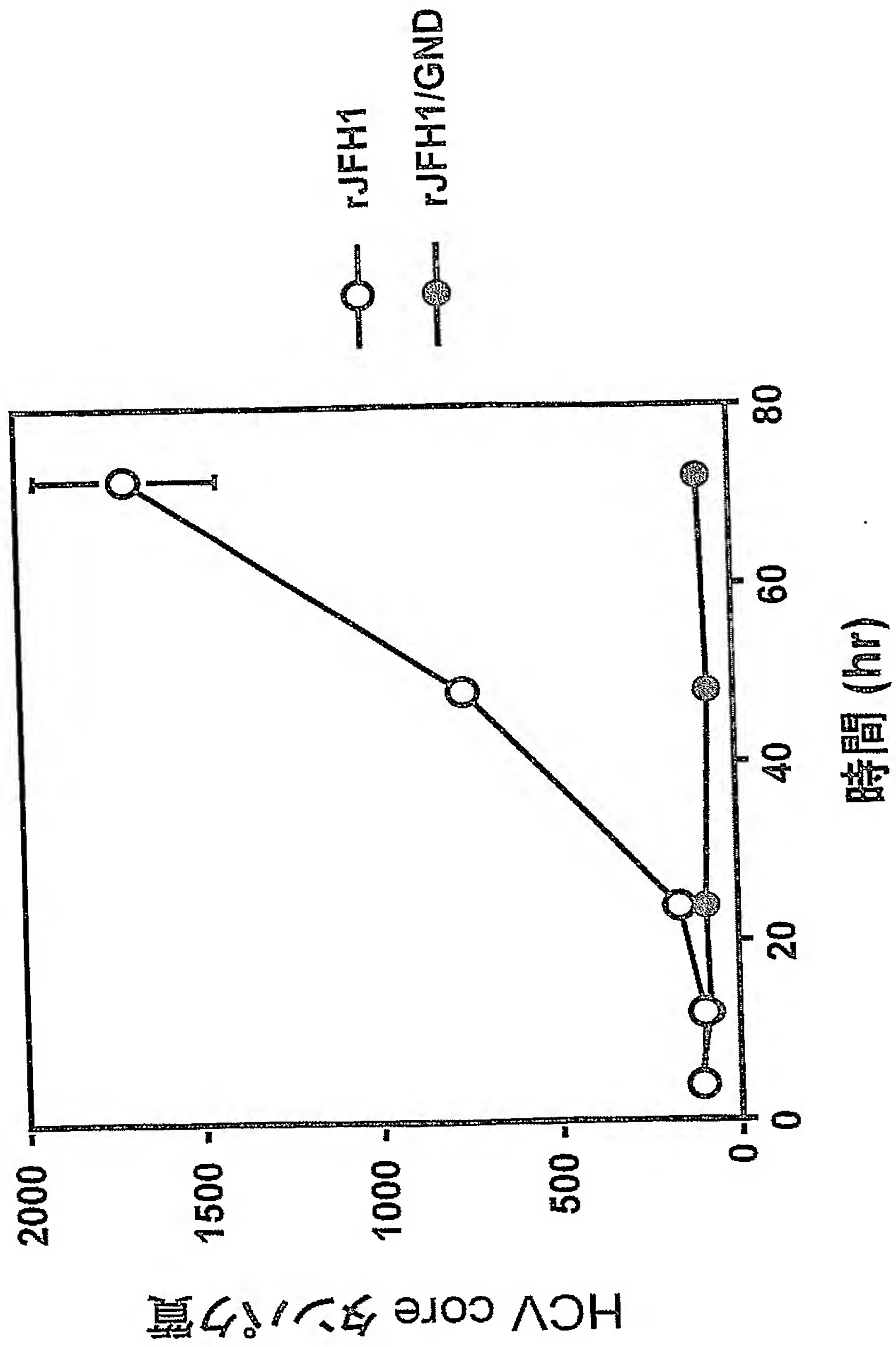


【図 2】

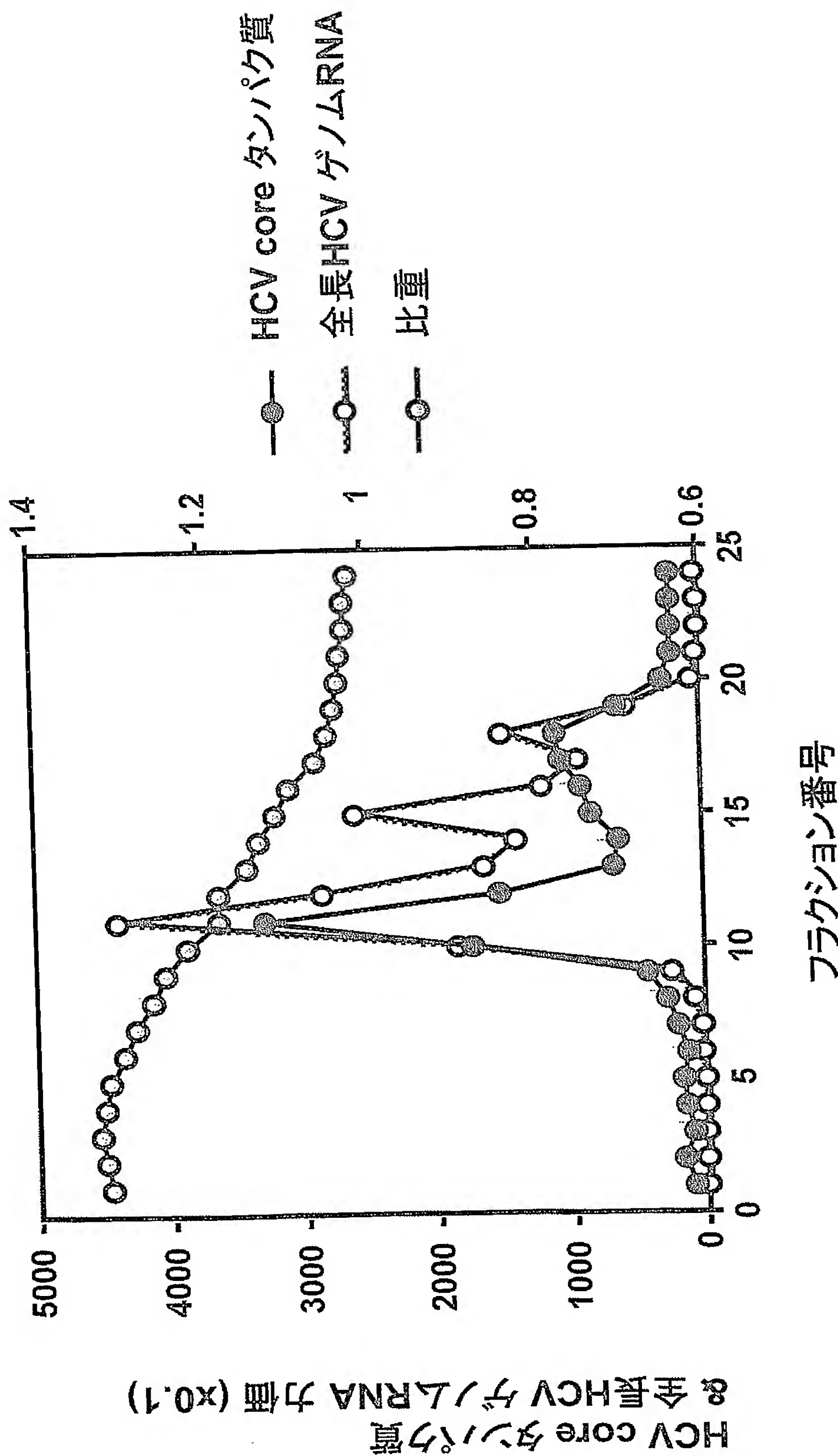




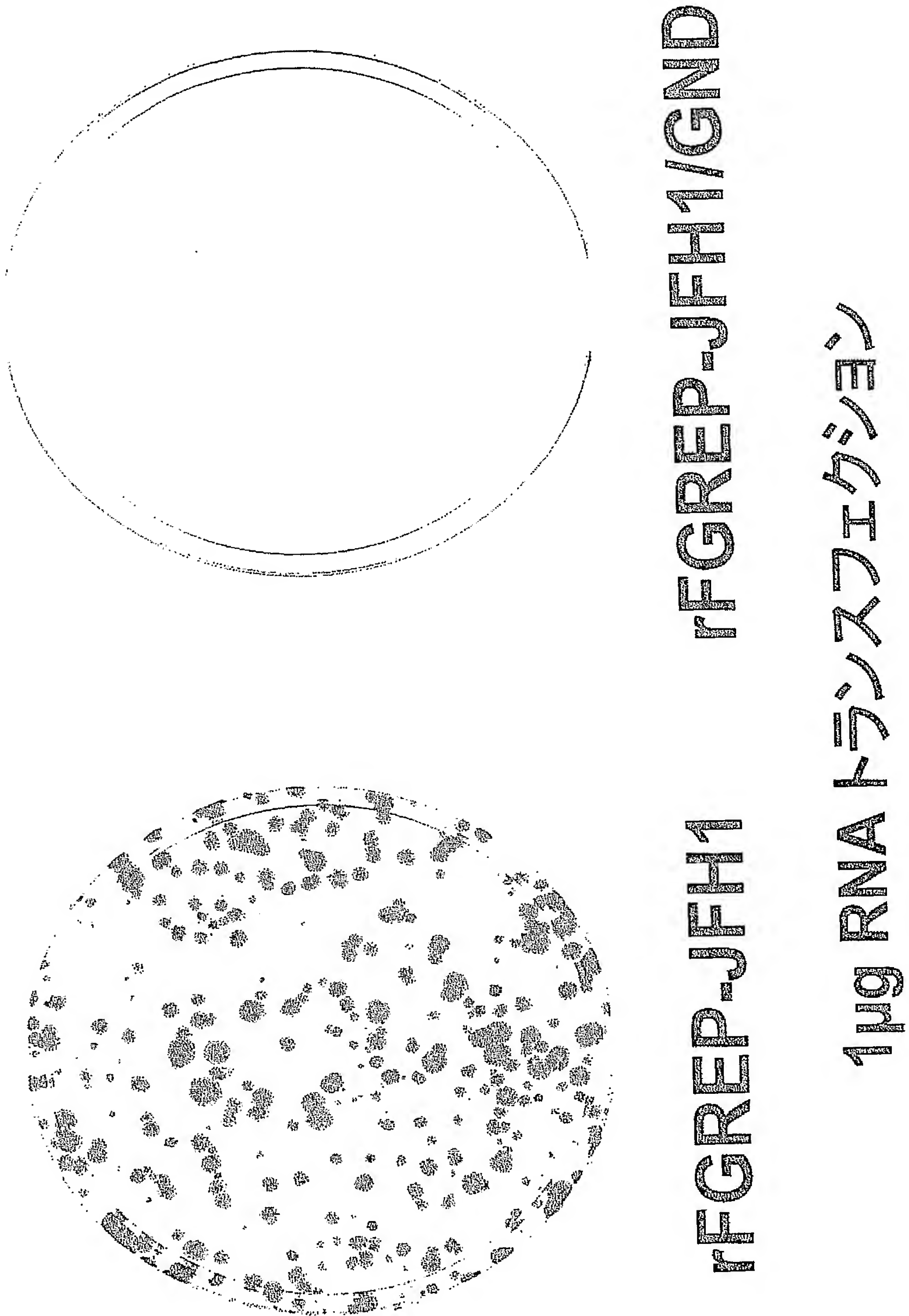
【図 3】



【図 4】

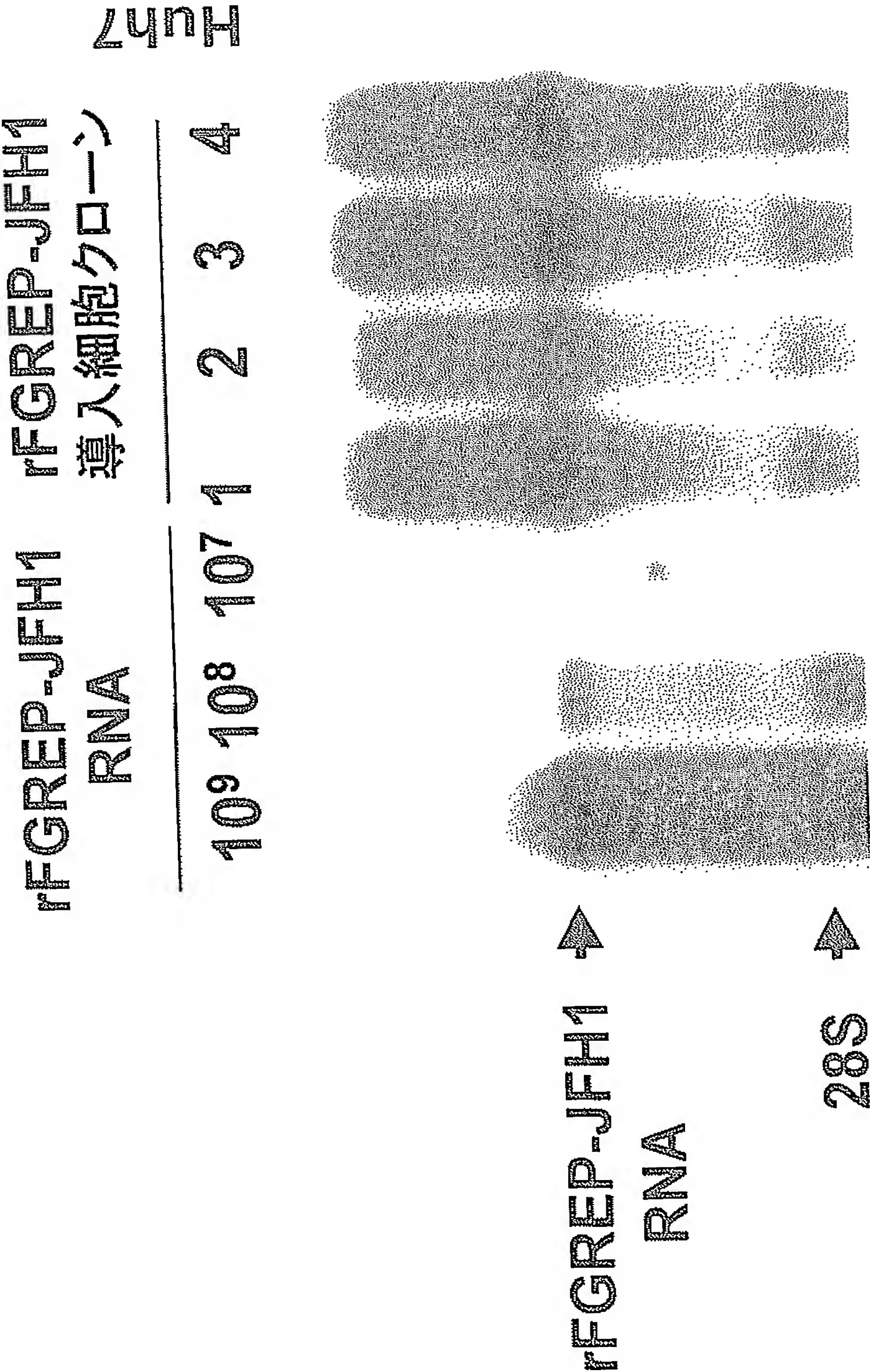


【図 5】





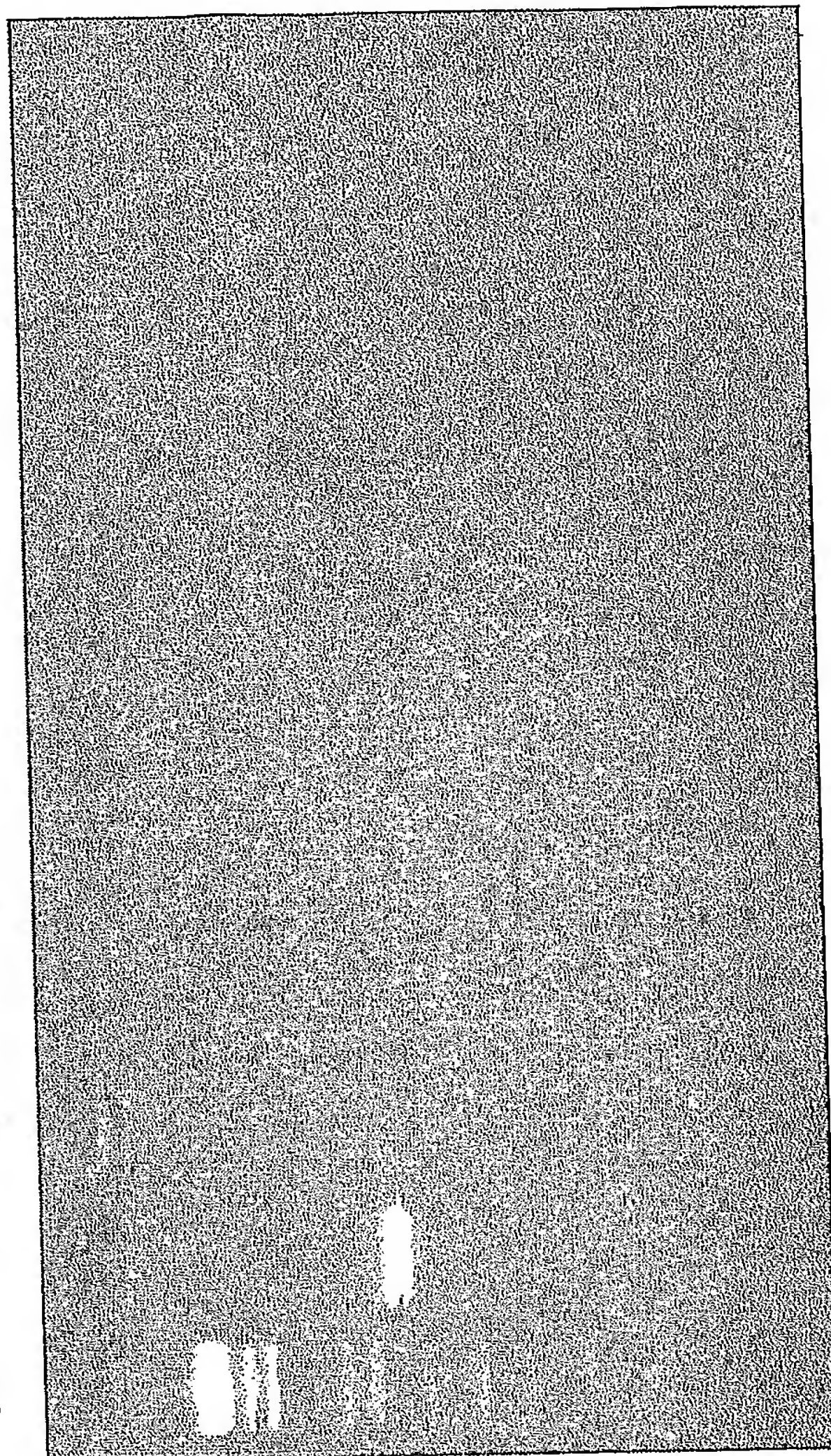
【図 6】



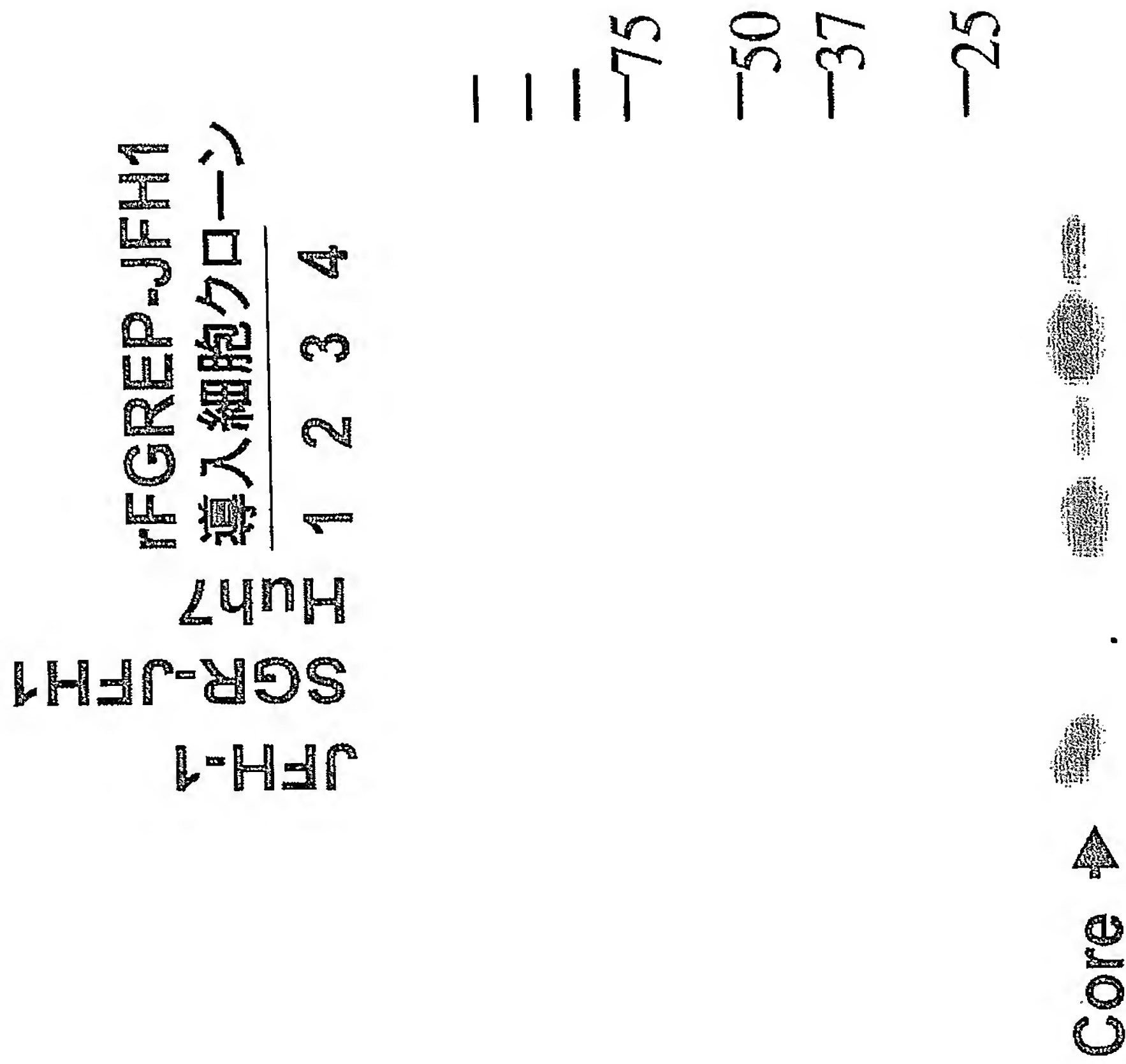
【図 7】

rFGREP-JFH1 導入細胞クローン

M P N 2-1 2-2 2-3 2-4 2-5 2-6 2-7 2-8

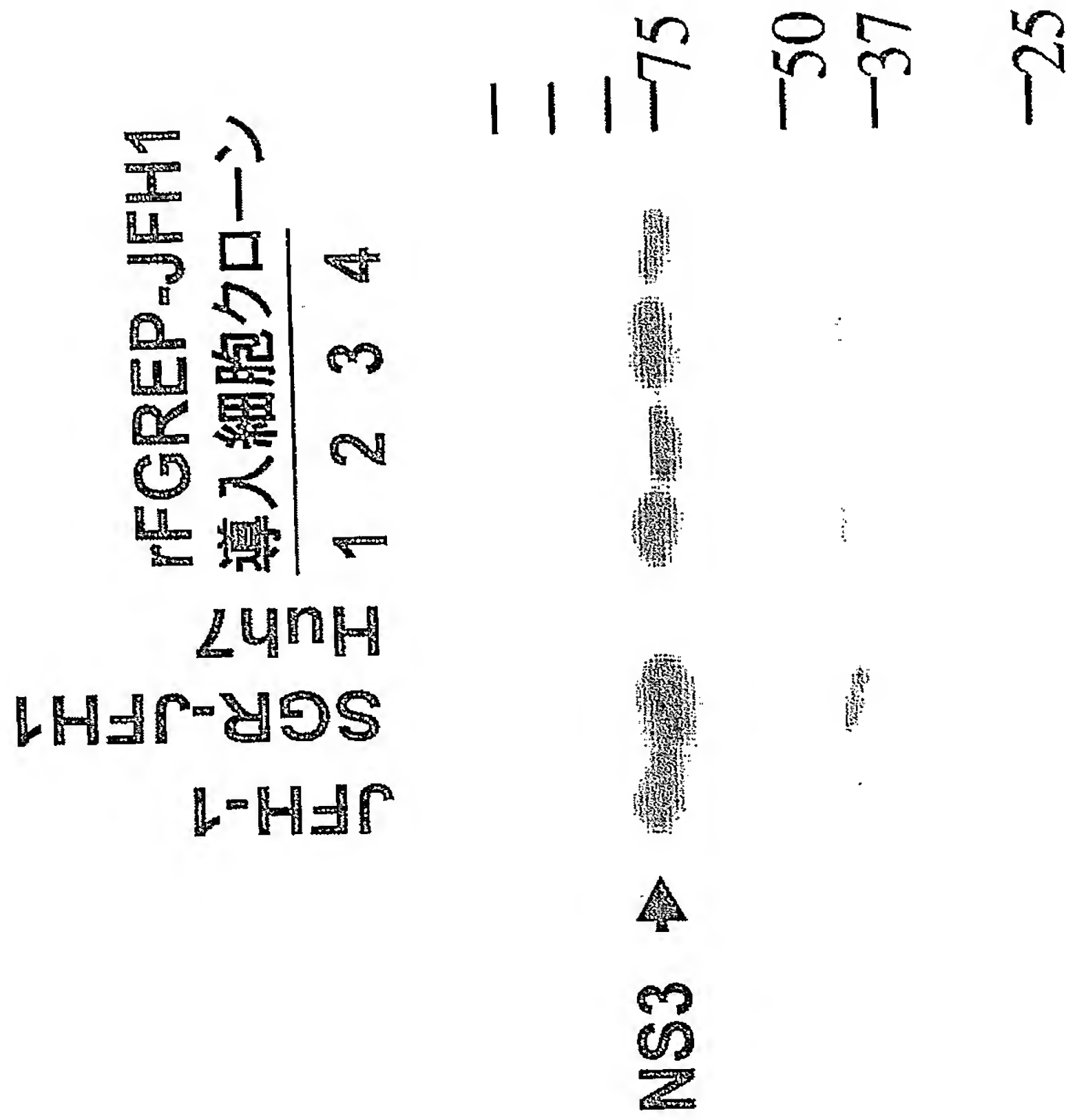


【図 8】

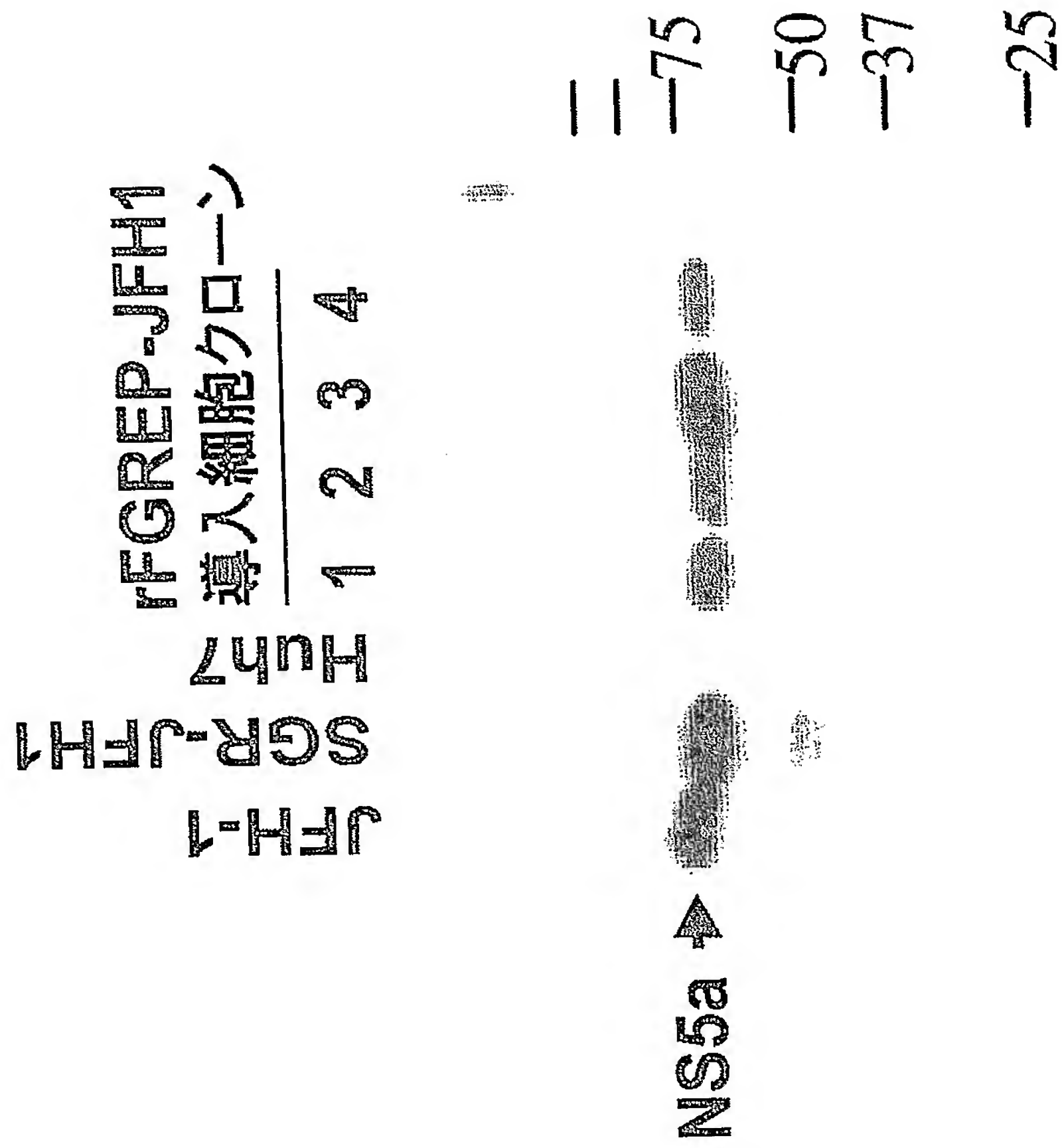




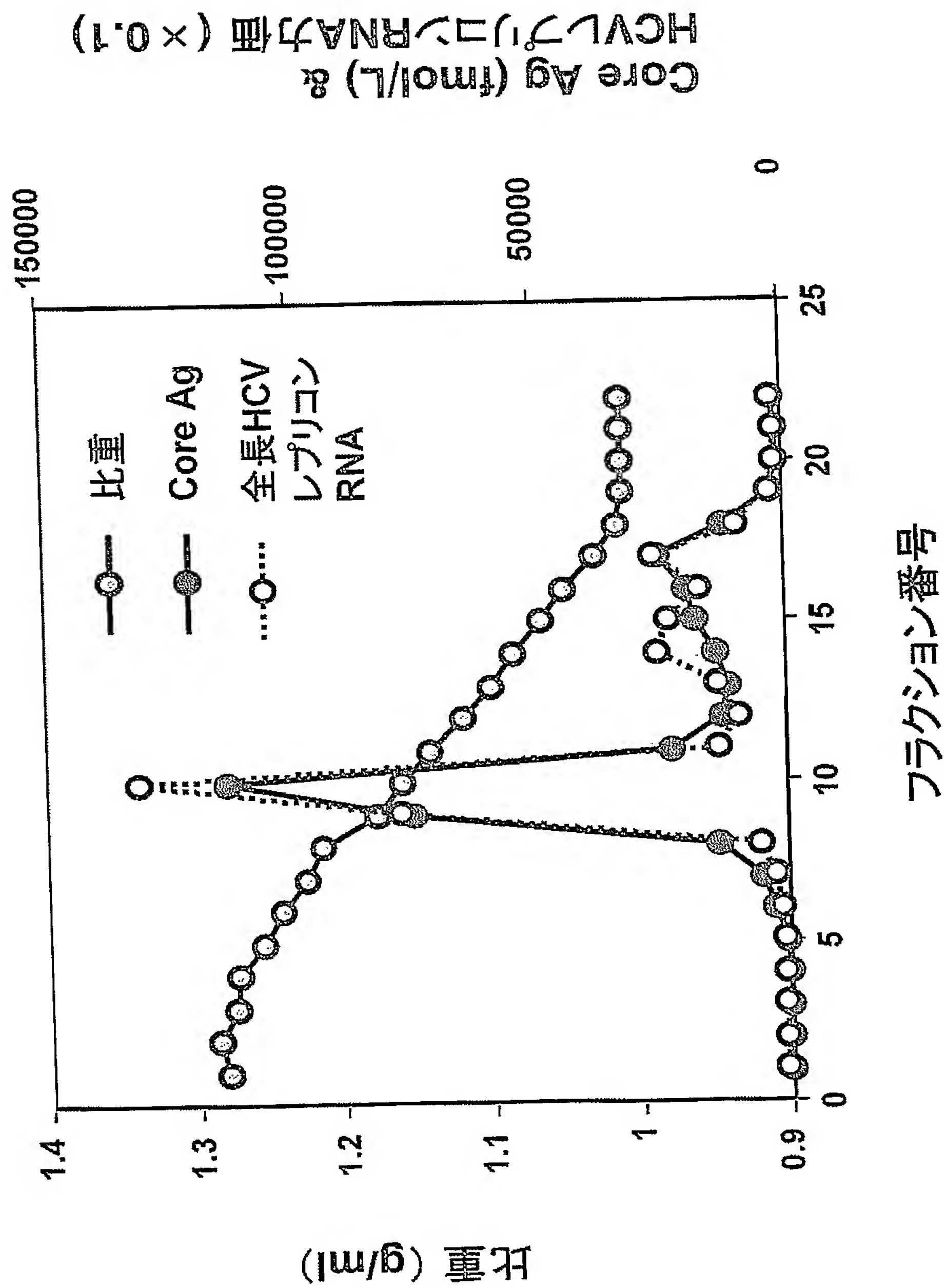
【図 9】



【図 10】

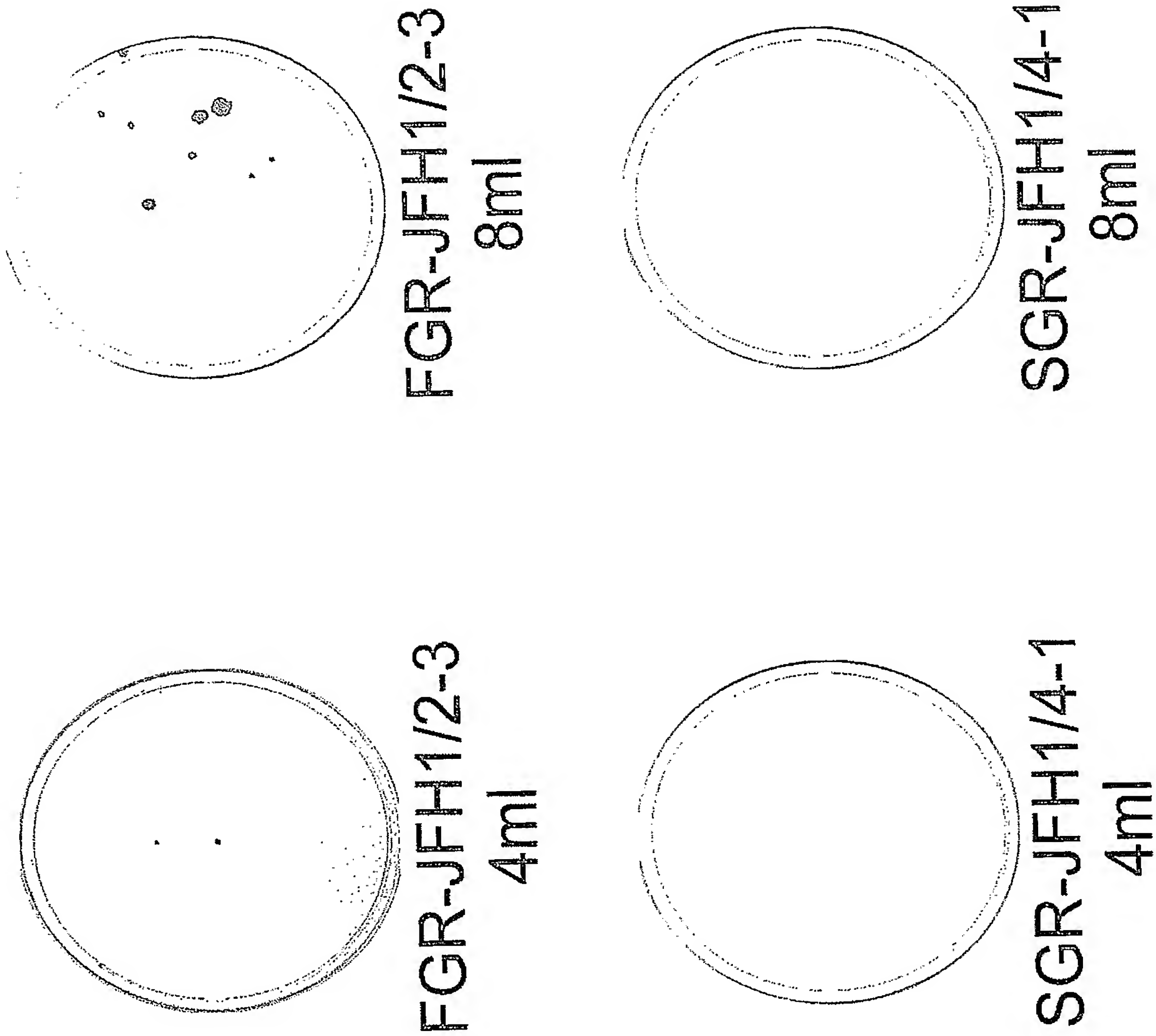


【図 11】





【図 1 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 HCV全長ゲノム配列を含むRNAを効率良く複製する方法、及び全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを含有するHCVウイルス粒子を細胞培養系により製造する方法の提供。

【解決手段】 遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスの全長ゲノムRNA配列と、少なくとも1つの選択マーカー遺伝子及び／又は少なくとも1つのリポーター遺伝子と、少なくとも1つのIRES配列とを含む塩基配列からなるレプリコンRNA、あるいは遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスの全長ゲノムRNAを導入した細胞を培養して、培養物中にウイルス粒子を産生させることを含む、C型肝炎ウイルス粒子の製造方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 0 4 5 4 8 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 9 1 0 6 3 3 9 4 ]

1 . 変 更 年 月 日

2 0 0 1 年 1 0 月 9 日

[ 変 更 理 由 ]

住 所 変 更

住 所

東 京 都 新 宿 区 西 新 宿 二 丁 目 8 番 1 号

氏 名

財 団 法 人 東 京 都 医 学 研 究 機 構



特願 2 0 0 4 - 0 4 5 4 8 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 3 1 5 9 ]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 1 0 月 2 5 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区日本橋室町 2 丁目 2 番 1 号

氏 名

東レ株式会社